

**PENGARUH PEMBERIAN HABBATUSSAUDA (*Nigella sativa*)
TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-6
(Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi
dengan Diet Tinggi Lemak)**

Tesis

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Sarjana S2



Magister Biomedik

Yenyen Sulistio Iriana Karyani

MBK.2015010188

**PROGAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH PEMBERIAN HABBATUSSAUDA (*Nigella sativa*)
TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-6
(Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi
dengan Diet Tinggi Lemak)

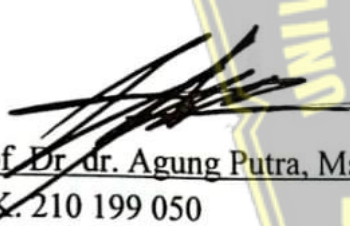
Disusun oleh
Yenyen Sulistio Iriana Karyani
MBK.2015010188


Menyetujui,
Pembimbing

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II


Prof. Dr. dr. Agung Putra, Msi. Med
NIK. 210 199 050


Prof. Dr. Ir. Titiek Sumarawati M.Kes
NIK. 220 198 045

Mengetahui,

Ketua Progam Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med
NIK. 210 199 050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar magister di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan ataupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 12 Desember 2023



(Yenyen Sulistio Iriana Karyani)

KATA PENGANTAR

Assalamua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillah puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala karunia dan ridho-NYA penulis telah diberi kesempatan sehingga tesis dengan judul “**PENGARUH PEMBERIAN HABBATUSSAUDA (*Nigella sativa*) TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-6 (Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi dengan Diet Tinggi Lemak)**” ini dapat diselesaikan dalam rangka memenuhi sebagian syarat untuk memperoleh derajat Sarjana Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Dengan selesainya tesis ini tidak terlepas dari doa dan dukungan berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang tulus kepada :

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. Gunarto SH, MHum.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF
3. Ketua Progam Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med dan juga sebagai dosen pembimbing I yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis
4. Ibu Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
5. Bapak Dr. Drs. Israhnanto Israjati, M.Si, selaku dosen penguji I yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis

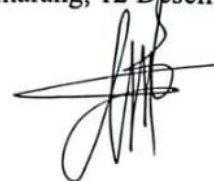
6. Ibu Prof. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, SKM, M.Kes selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Bapak Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku dosen penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Seluruh Dosen Progam Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
9. Kedua Orangtua Letda (Purn) Yuyun Karyono dan Sri Susilowati serta saudari penulis yang selalu menghaturkan doa dan memberi dukungan.
10. Teman dan rekan yang selalu memberikan semangat, motivasi, perhatian dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan memerlukan pengembangan lanjut agar benar-benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk membangun kesempurnaan tesis ini.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan.

Wassalammua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Semarang, 12 Desember 2023



Yenyen Sulistio Iriana Karyani

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Originalitas Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).....	10
2.2. Interleukin 6 (IL-6).....	15
2.3. Hiperkolesterolemia	20
2.4. Habbatussauda (<i>Nigella sativa</i>).....	28
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS....	35
3.1. Kerangka Teori.....	35
3.2. Kerangka Konsep	38
3.3. Hipotesis	39
BAB IV METODE PENELITIAN	40
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	40
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian.....	41

4.3. Variabel dan Definisi Operasional	43
4.4. Definisi operasional.....	43
4.5. Alat dan Bahan Penelitian	45
4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja.....	47
4.7. Alur Kerja.....	51
4.8. Analisis data	54
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	55
5.1. Hasil Penelitian.....	55
5.2. Pembahasan	62
5.3. Keterbatasan Penelitian	67
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	69
6.1. Kesimpulan.....	69
6.2. Saran.....	70
DAFTAR PUSTAKA.....	71
LAMPIRAN.....	77



DAFTAR SINGKATAN



DD	: <i>Death domain</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
ELISA	: <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
HDL	: <i>High Density Lipoprotein</i>
HMG-CoA	: <i>The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A</i>
HO-1	: <i>Heme oxygenase-1</i>
IDL	: <i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IKK	: <i>Inhibitory-κB kinase</i>
Il-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-6R	: <i>Interleukin 6 receptor</i>
JAK 1,2	: <i>Janus kinase 1,2</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LPL	: <i>Lipoprotein lipase</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDA	: <i>Malondialdehyd</i>
MLKL	: <i>mixed lineage kinase domain like protein</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor erythroid-2-related factor-2</i>
PAI-1	: <i>Plasminogen activator inhibitor type</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
RIP	: <i>Receptor interacting protein</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvate Transaminase</i>
sIL-6R	: <i>Soluble interleukin 6 receptor</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
STAT3	: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>

TG : *Triacylglycerol*
TNFR1 : *TNF receptor associated factor 1*
TNFR2 : *TNF receptor associated factor 2*
TNF- α : *Tumour Necrosis Factor α*
TRADD : *TNF-R1 associated death domain potein*
Tyk2 : *Tyrosine kinase 2*
VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*



DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1 Penelitian habbatussauda (<i>Nigela sativa</i>) yang pernah dilakukan.....	5
Tabel 5. 1. Hasil analisis rerata kadar TNF- α dan IL-6	55
Tabel 5. 2. Analisis deskriptif, normalitas, homogenitas dan perbandingan kadar TNF- α antar kelompok.....	56
Tabel 5. 3. Analisis perbedaan kadar TNF- α (pg/mL) antar kelompok.....	57
Tabel 5. 4. Analisis deskriptif, normalitas, homogenitas dan perbandingan kadar IL-6 antar kelompok.....	59
Tabel 5. 5. Analisis perbedaan kadar IL-6 (pg/mL) antar kelompok.....	60



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 2 Modalitas persinyalan IL-6	17
Gambar 2. 3 Aktivitas persinyalan IL-6	18
Gambar 2. 4 IL-6 pada gangguan metabolik.....	19
Gambar 2. 5 Metabolisme kilomikron	24
Gambar 2. 6 Metabolisme VLDL, IDL dan LDL	25
Gambar 2. 7 Metabolisme intraseluler kolesterol	27
Gambar 3. 1 <i>Thymoquinone</i> mengaktivasi PPAR- γ	36
Gambar 3. 2 Kerangka Teori.....	38
Gambar 3. 3 Kerangka Konsep.....	38
Gambar 4. 1 Skema Rancangan Penelitian	40
Gambar 4. 2 Alur Kerja Penelitian.....	53
Gambar 5. 1 Deskripsi dan perbandingan kadar TNF- α antar kelompok	58
Gambar 5. 2 Deskripsi dan perbandingan kadar IL-6 antar kelompok.....	61
Gambar 5. 3 Gambar mekanisme <i>Nigella sativa</i> sebagai antioksidan.....	66
Gambar 5. 4 Mekanisme TQ menurunkan 1 kadar TNF- α dan IL-6	67

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 8. 1 Ethical Clearans.....	77
Lampiran 8. 2 Hasil Penelitian.....	78
Lampiran 8. 3 Hasil Analisis Statistika.....	82
Lampiran 8. 4 Tabel Induksi Diet Tinggi Lemak Pada Tikus.....	83
Lampiran 8. 5 Dokumentasi Pelaksanaan Penelitians.....	83



ABSTRAK

Latar Belakang : Habbatussauda (*Nigella sativa*) mengandung zat aktif *thymoquinone* yang memiliki efek sebagai antihiperkolesterolemia, antioksidan dan antiinflamasi. Pemberian *Nigella sativa* oil dapat memperbaiki kadar TNF- α dan IL-6 pada kondisi hiperkolesterolemia. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian habbatussauda (*Nigella sativa*) terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diberi diet tinggi lemak

Metode : Penelitian eksperimental *post test only control group design* selama 45 hari. Sampel 30 ekor tikus galur wistar berusia 8 minggu dengan berat badan 150-200 gram dan diadaptasi selama 7 hari, dibagi menjadi 5 kelompok secara acak yaitu : kelompok kontrol normal tanpa pelakuan (K1), kelompok kontrol negatif diberi diet tinggi lemak (K2), kelompok perlakuan diberi diet tinggi lemak dan habbatussauda 0,001 mL/gBB (K3), kelompok perlakuan diberi diet tinggi lemak dan habbatussauda 0,002 mL/gBB (K4), kelompok perlakuan diberi diet tinggi lemak dan habbatussauda 0,004 mL/gBB (K5). Habbatussauda diberikan pada 2 minggu terakhir. Kadar TNF- α dan IL-6 diukur dengan metode ELISA. Data dianalisis dengan *One Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Least Significance Different* dengan menggunakan SPSS 22.

Hasil : Rerata + SD kadar TNF- α pada kelompok K1, K2, K3, K4 dan K5 adalah $83,36 \pm 23,73$, $246,47 \pm 43,21$, $155,83 \pm 36,38$, $171,80 \pm 22,50$, dan $195,77 \pm 47,67$ pg/mL. Pada IL-6 kelompok K1, K2, K3, K4 dan K5 adalah $33,83 \pm 8,55$, $115,11 \pm 16,51$, $58,85 \pm 19,71$, $76,70 \pm 6,03$, dan $78,05 \pm 17,33$ pg/mL. Uji *One Way Anova* untuk kadar TNF- α , dan IL-6 menunjukkan adanya perbedaan bermakna di antara kelompok ($p= 0,000$, dan $p= 0,000$). Pada uji *post hoc* kadar TNF- α dan IL-6 di K3, K4 dan K5 yang secara bermakna lebih rendah daripada di K2 ($p= 0,000$).

Kesimpulan : Pemberian habbatussauda (*Nigella sativa*) dapat menurunkan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

Kata Kunci : habbatussauda, *Nigella sativa*, hiperkolesterolemia, obesitas, TNF- α , IL-6

ABSTRACT

Background: Habbatussauda (*Nigella sativa*) contains *thymoquinone* as an active substance that has antihypercholesterolemic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Nigella sativa* oil can improve TNF- α and IL-6 levels in hypercholesterolemia conditions. The aim of this study was to investigate the effect of black seed (*Nigella sativa*) in TNF- α and IL-6 levels in rat fed a high-fat diet.

Method: Experimental *post test only control group design* study was conducted 30 wistar rats aged 8 weeks with body weight of 150-200 grams was adapted for 7 days, were randomly divided into 5 groups: normal control group without treatment (K1), negative control group induced a high fat diet (K2), group The treatment group was induced a high-fat diet and 0.001 mL/gBW of habbatussauda (K3), the treatment group was induced a high-fat diet and 0.002 mL/gBW of habbatussauda (K4), the treatment group was induced a high-fat diet and 0.004 mL/gBW of habbatussauda (K5). The study lasted for 45 days and was given habbatussauda in the last 2 weeks. The TNF- α and IL-6 levels were measured using the ELISA method. The data were analyzed with the *One Way Anova* and then proceeded with the *Post Hoc Least Significance Different test* using SPSS 22.

Results: Mean + SD levels of TNF- α in groups K1, K2, K3, K4 and K5 were 83.36 ± 23.73 , 246.47 ± 43.21 , 155.83 ± 36.38 , 171.80 ± 22.50 , and 195.77 ± 47.67 pg/mL. In the IL-6 groups K1, K2, K3, K4 and K5 were 33.83 ± 8.55 , 115.11 ± 16.51 , 58.85 ± 19.71 , 76.70 ± 6.03 , and 78.05 ± 17.33 pg/mL. *One Way Anova* test for levels of TNF- α and IL-6 showed significant differences between groups ($p= 0.000$, and $p= 0.000$). In the *post hoc test*, the levels of TNF- α and IL-6 in K3, K4 and K5 were significantly lower than in K2 ($p= 0.000$).

Conclusion: The administration of habbatussauda (*Nigella sativa*) can reduce levels of TNF- α and IL-6 in rats induced by a high-fat diet.

Keywords: habbatussauda, *Nigella sativa*, hypercholesterolemia, obesity, TNF- α , IL-6

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hiperkolesterolemia adalah suatu kondisi konsentrasi kolesterol dalam darah lebih dari batas normal. Hiperkolesterolemia dapat meningkatkan sitokin proinflamasi sistemik seperti TNF- α , IL-6 dan IL-1 β yang berperan dalam pembentukan plak aterosklerosis. Kondisi ini akan menyebabkan berkembangnya komplikasi penyakit kardiovaskuler.¹ Obat golongan statin sering digunakan dalam pengobatan hiperkolesterolemia, namun dianggap kurang memuaskan karena efek samping yang ditimbulkan.^{2,3} Terapi alternatif dengan bahan alami saat ini banyak dikembangkan seperti habbatussauda (*Nigella sativa*) yang memiliki efek anti-hiperkolesterolemia, efek anti-inflamasi dan antioksidan.^{3,4,5} Studi pada tikus yang diberi diet tinggi lemak 28 hari, kemudian diberikan *Nigella sativa* 14 hari dengan berbagai dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 450 mg/kgBB menunjukkan bahwa 450 mg/kgBB *Nigella sativa* dapat menurunkan kadar MDA 30,20% dan menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi tunika mukosa jejunum tikus hiperkolesterolemia.⁶ Namun saat ini hanya ada sedikit data penelitian mengenai efek habbatussauda (*Nigella sativa*) terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus hiperkolesterolemia.

Proporsi penduduk Indonesia tahun 2018 usia ≥ 15 tahun dengan kadar lipid yang abnormal berupa kolesterol total 21,2%, LDL 37,3%, trigliserida 27,9% dan HDL 24,3%.⁷ Hiperkolesterolemia berkaitan erat dengan peningkatan risiko beberapa penyakit kronis, yaitu diabetes tipe 2, aterosklerosis, penyakit kardiovaskular (CVD), penyakit perlemakan hati non-alkohol dan beberapa jenis kanker.³ Pada tahun 2017 secara global, obesitas dilaporkan menyebabkan 2,4 juta kematian dan 70,7 juta *disability-adjusted life years* (DALYs) pada perempuan dan 2,3 juta kematian serta 77 juta DALY pada laki-laki. Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab utama DALY terkait dengan obesitas, diikuti oleh diabetes mellitus dan penyakit ginjal, serta neoplasma.⁸ Prevalensi penyakit jantung pada usia ≥ 15 adalah 18,4%. Komplikasi yang muncul akibat hiperkolesterolemia menyebabkan ketergantungan untuk melakukan aktivitas sehari-hari terutama pada usia tua. Proporsi tingkat ketergantungan pada usia ≥ 60 tahun menurut penyakit yaitu penyakit jantung 36 %, DM 36,41 % dan stroke 63,66%.⁷

Hasil penelitian mengenai model tikus hiperlipidemik dengan diberi diet tinggi lemak (kolesterol 0,5%, minyak kelapa 3% dan asam kolat 0,25%) selama 30 hari dapat menyebabkan peningkatan kadar sitokin proinflamasi kadar TNF- α dan IL-6 secara signifikan.⁹ Habbatussauda memiliki senyawa aktif utama *thymoquinone*, memiliki sifat anti-hiperkolesterolemia, anti-inflamasi dan antioksidan.¹⁰ Habbatussauda sebelumnya sudah diteliti pada tikus yang diberi diet tinggi lemak selama 28 hari dilanjutkan dengan

pemberian *Nigella sativa* selama 14 hari dengan dosis terapi 450 mg/kgBB menghasilkan penurunan kadar MDA 30,20% dan menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi tunika mukosa jejunum tikus hiperkolesterolemia.⁶ Studi lain juga menemukan bahwa pemberian bubuk *Nigella sativa* dengan dosis 300 mg/kg/hari selama 6 minggu setelah induksi obesitas secara signifikan menormalkan profil lipid, menurunkan berat badan, serum *atherogenic index* (AI) dan serum ALT.¹¹ Habbatussauda memiliki efek agonis terhadap PPAR- γ dan meningkatkan regulasi reseptor LDL di hepatosit sehingga terjadi pembuangan kolesterol, dan penekanan gen HMG-CoA R yang mempengaruhi metabolisme kolesterol, menyebabkan penurunan stress oksidatif, TNF- α dan IL-6,. Habbatussauda juga bertindak dengan melakukan penghambatan pada factor transkripsi NF- κ B yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi berbagai jenis sitokin inflamasi (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , dan MMP3), COX-2, dan iNOS.¹⁰

Penelitian mengenai habbatussauda (*Nigella sativa*) dalam mempengaruhi kadar kolesterol dan kemampuannya dalam mengendalikan proses inflamasi telah banyak dilakukan, namun kurangnya studi mengenai pengaruh habbatussauda (*Nigella sativa*) terhadap sitokin proinflamasi yang diinduksi oleh kondisi hiperkolesterolemia menyebabkan perlunya penelitian lebih lanjut. Berdasarkan hal tersebut maka diperlukan penelitian untuk melihat pengaruh habbatussauda (*Nigella sativa*) dalam mencegah proses inflamasi yang berlangsung pada kondisi hiperkolesterolemia yang dapat diamati melalui kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus putih jantan galur

wistar yang diberi diet tinggi lemak.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah habbatussauda mempunyai pengaruh terhadap penurunan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diberi diet tinggi lemak?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh habbatussauda terhadap penurunan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus galur Wistar yang diberi diet tinggi lemak

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui rerata kadar TNF- α dan IL-6 pada kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan, kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan kelompok yang diberi diet tinggi lemak serta diberi habbatussauda dalam berbagai dosis (0,001 mL/gBB; 0,002 mL/gBB; 0,004 mL/gBB)

1.3.2.2. Menganalisis perbedaan rerata kadar TNF- α dan IL-6 pada kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan, kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan kelompok yang diberi diet tinggi lemak serta diberi habbatussauda dalam berbagai dosis (0,001 mL/gBB; 0,002 mL/gBB; 0,004 mL/gBB)

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1. 1 Penelitian habbatussauda (*Nigella sativa*) yang pernah dilakukan

Nama Penyusun dan Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
Kumar R, <i>et al.</i> 2020 ⁹	Hesperidin attenuates altered redox homeostasis in an experimental hyperlipidaemic model of rat ⁹	In Vivo, Eksperimental	Model tikus hiperlipidemik dengan diberi diet tinggi lemak (kolesterol 0,5%, minyak kelapa 3% dan asam kolat 0,25%) selama 30 hari dapat menyebabkan peningkatan kadar sitokin proinflamasi kadar TNF- α dan IL-6 secara signifikan
Esmail <i>et al.</i> 2021 ¹¹	Effect of <i>Nigella sativa</i> , atorvastatin, or L-Carnitine on high fat diet-induced obesity in adult male Albino rats	In Vivo, Eksperimental	Pemberian habbatussauda selama 6 minggu pada tikus albino model obesitas dapat menormalkan profil lemak, menurunkan berat

			<p>badan di akhir penelitian, serta serum aterogenik indeks dan kadar SGPT.</p> <p>Pembuatan model obesitas dilakukan melalui pemberian diet tinggi lemak yang digunakan terdiri atas 1 g kolesterol, 9 g lemak jenuh (minyak sawi) yang dicampur dalam 90 g bubuk pakan standar selama 6 minggu sebelum dan 6 minggu selama pemberian berbagai intervensi.</p>
Lestari, Vici Yulita <i>et al.</i> 2018 ⁶	Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam (Nigella sativa) Terhadap	In Vivo, Eksperimental	Tikus diberi diet tinggi lemak 28 hari dilanjutkan dengan pemberian Nigella sativa selama 14 hari

	<p>Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histopatologi Jejunum pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Model Hiperkolesterolemia yang Diberi Diet Tinggi Lemak.⁶</p>		<p>dengan dosis 150 mg/kgBB, 300 mg/kgB dan 450 kgBB. Hasil penelitian menunjukkan dengan dosis 450 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA 30,20% dan menghasilkan perbaikan gambaran histopatologi tunika mukosa jejunum tikus hiperkolesterolemia</p>
<p>Saheb <i>et al.</i> 2016¹²</p>	<p>Antioxidant Effect of <i>Nigella sativa</i> Seed Powder and Thymoquinone in Normal and Sterptozotocine Induced Diabetic Albino Rats.¹²</p>	<p>In Vivo, Eksperimental</p>	<p>Pemberian bubuk <i>Nigella sativa</i> 300 mg/kgBB dan timokuinon 4 mg/kgBB mempunyai efek antioksidan pada tikus diabetes dengan menurunkan kadar MDA dan</p>

			meningkatkan kadar SOD tikus diabetes yang diberi streptozotosin
--	--	--	--

Penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya, di mana sebelumnya diteliti mengenai manfaat habbatussauda pada hewan model obesitas, hiperlipidemia atau hiperkolesterolemia, juga manfaat habbatussauda terhadap indeks aterogenik juga marker kerusakan hati (SGPT) dan kadar MDA, sedangkan penelitian ini ingin membuktikan manfaat habbatussauda pada *marker* inflamasi IL-6 dan TNF- α yang diinduksi diet tinggi lemak. Hiperkolesterolemia akan menyebabkan jaringan adiposa melepaskan mediator inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α yang akan meningkatkan ROS. Kondisi tersebut akan menyebabkan jejas pada endotelium yang akan meningkatkan resiko aterosklerosis. Habbatussauda dapat menurunkan aktivitas HMG-CoA reduktase hepatic, sehingga dapat mempengaruhi metabolisme kolesterol dengan menurunkan kadar trigliserida, sehingga terjadi penurunan kadar IL-6 dan TNF- α .

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Memberikan dasar penelitian mengenai pengaruh habbatussauda terhadap penurunan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus jantan galur wistar yang diberi diet tinggi lemak

1.5.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi di bidang kedokteran dan masyarakat mengenai alternatif terapi dengan habbatussauda sebagai tatalaksana hiperkolesterolemia.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

2.1.1. Definisi

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) adalah sitokin inflamasi pleiotropik yang terutama diproduksi oleh monosit, makrofag dan sel T.¹³ Sitokin ini merupakan protein 17 kDA yang terdiri atas 157 asam amino, protein homotrimer (protein yang terdiri atas tiga unit polipeptida identik) yang juga diproduksi oleh sel-sel *natural killer* (NK).¹⁴ TNF- α juga disebut sebagai hormon peptida makrofag yang mempunyai dampak sistemik penting, antara lain berefek kaheksia, leukositosis serta anemia. TNF- α juga dapat meningkatkan aktivitas koagulan endotel kapiler yang mempromosikan trombosis mikrovaskuler, nekrosis jaringan, kerusakan sel-sel endotel sehingga menyebabkan kebocoran cairan mikrovaskular yang dapat berpindah masuk ke intraseluler terutama pada otot-otot skeletal dan menurunkan volume plasma (peran pada sepsis).¹⁵ TNF- α merupakan salah satu faktor terlarut monokin yang diproduksi oleh makrofag dan berperan dalam inflamasi.¹⁶ TNF- α memiliki banyak peran metabolisme antara lain pada proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel serta metabolisme lipid juga koagulasi.¹⁷ TNF- α juga menginduksi resistensi insulin, anoreksia, dan kehilangan berat badan.¹⁸ TNF- α juga merupakan sitokin yang berperan dalam meningkatkan sistem imun.¹⁹

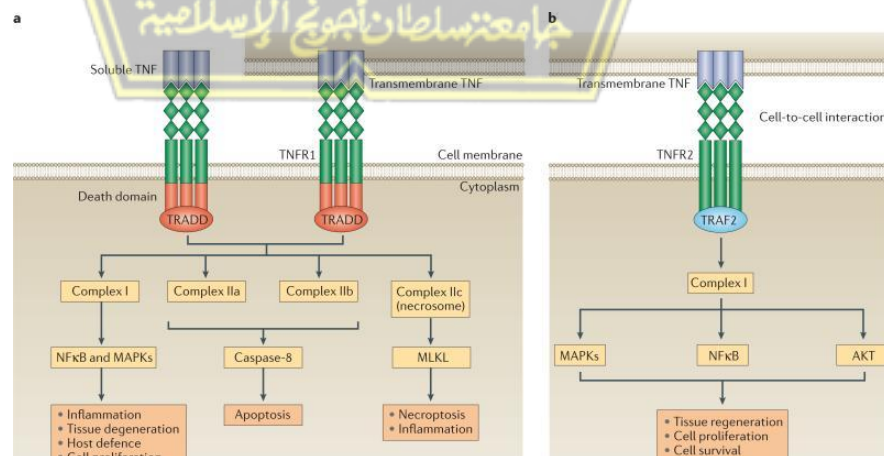
Tumor necrosis factor- α yang juga disebut sebagai *cachectin* atau *cachexin* juga diproduksi dalam jumlah terbatas oleh sel B, sel endotel dan otot, fibroblas serta osteoklas. TNF- α dalam kondisi terikat membran dan terlarut. TNF- α bertranslokasi ke membran sel dimana enzim pengubah TNF- α melepaskan molekul 26 kDa yang terikat membran ke dalam lingkungan ekstraseluler sebagai protein 17 kDa. Aktivitas enzim ini tidak hanya melepaskan TNF- α dari membran plasma, tetapi juga menghambat reseptor TNF- α dari permukaan, yang bertindak sebagai penghambat aksinya. TNF- α yang terikat membran maupun yang dilepaskan sama-sama aktif, fungsi mereka berbeda tergantung pada lokasinya.²⁰

Tumor Necrosis Factor (TNF- α) memiliki efek terapi ketika diekspresikan secara lokal oleh sel imun, tetapi jika disekresikan ke dalam sirkulasi akan menyebabkan disregulasi sehingga menyebabkan penyakit termasuk kanker. TNF- α dikenal sebagai mediator utama inflamasi, di mana setelah terpapar stimulus patogen TNF- α akan menginduksi mediator inflamasi lain dan protease sebagai pemeran respon inflamasi. TNF- α juga diproduksi oleh sel tumor dan dapat bertindak sebagai tumor promoter endogen.²¹

2.1.2. Jalur pensinyalan TNF- α

Mediasi efek TNF- α terjadi melalui 2 (dua) reseptornya yaitu TNFR1 dan TNFR2. Reseptor yang pertama umum terekspresi di semua jenis sel dan berperan utama dalam mengaktivasi NF- κ B, sedangkan reseptor yang kedua hanya terekspresi pada sel endotel dan sel imun. Bonding antara TNF- α dengan reseptor pertama menginduksi trimerisasi reseptor dan rekrutmen protein adaptor TNF-R1 associated death domain protein (TRADD) yang terikat pada death domain (DD) spesifik di domain sitoplasma reseptor tersebut. TRADD merekrut TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) dan mengaktivasi I κ B kinase (IKK) dengan mediasi receptor interacting protein (RIP).²² Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) adalah mediator utama kematian sel dan inflamasi.²³

Modalitas pensinyalan dan bioaktivitas downstream reseptor TNF- α pada Gambar 2.1:



Gambar 2. 1. Modalitas persinyalan dan bioaktivitas downstream reseptor TNF- α ²²

Pensinyalan TNF receptor 1 (TNFR1) diaktivasi oleh TNF- α transmembran dan terlarut. TNFR1 dengan DD yang dimiliki merekrut TRADD. Pengikatan TNFR1 oleh TNF- α transmembran atau terlarut menyebabkan penyusunan kompleks I yang mengaktivasi NF κ B dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Pensinyalan kompleks I TNFR1 menginduksi inflamasi, degenerasi jaringan, kelangsungan hidup sel dan proliferasi, serta pengaturan sistem pertahanan imun terhadap patogen. Modalitas pensinyalan lain terkait dengan apoptosis juga dapat diaktivasi oleh TNFR1 yang dimediasi oleh pembentukan kompleks IIa dan IIb (riposom), sedangkan kompleks IIc (nekrosom) menginduksi nekroptosis dan inflamasi dengan dimediasi oleh *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) (Gambar 2.1a). Reseptor kedua dari TNF- α terutama diaktivasi oleh TNF- α transmembran secara interaksi sel to sel. TNFR2 merekrut TRAF2 melalui domain TRAF, memicu pembentukan kompleks I dan mengaktivasi NF κ B, MAPK dan AKT downstream. TNFR2 terutama memediasi bioaktivitas homeostatik seperti regenerasi jaringan, proliferasi dan kelangsungan hidup sel. Jalur tersebut juga dapat menginisiasi efek inflamasi dan pertahanan host terhadap patogen (Gambar 2.1b).²²

3. Cara Pengukuran

Pengukuran TNF- α dalam darah tepi merupakan alat yang berguna untuk menilai respon inflamasi pada berbagai macam

penyakit. TNF- α stabil dalam serum yang di simpan pada suhu 4⁰C hingga satu minggu setelah sentrifugasi sampel darah dan perlakuan dengan anti-TNF- α biologis dapat menyebabkan pengukuran negatif palsu.²⁴

Pengukuran TNF- α menggunakan metode ELISA dan flowsitometri telah digunakan dalam berbagai uji klinis.²⁵ Akurasi dan presisi pengukuran sitokin (TNF- α) antar uji dapat bervariasi, meskipun pengujian dilakukan dengan presisi yang baik di laboratorium individu, potensi variabilitas antar laboratorium tetap tinggi karena perbedaan antibodi, standar kalibrasi, reagen deteksi, metode deteksi, dan metode analisis data yang diaplikasikan.²⁶

Prinsip uji ELISA untuk TNF- α dilakukan dengan metode sandwich biotin antibodi ganda yang ditambahkan dalam sumuran (*well*) yang telah dilapisi dengan antibodi monoklonal TNF- α dan selanjutnya diinkubasi. Antibodi berikutnya yang ditambahkan yaitu antibodi TNF- α berlabel biotin agar dapat bereaksi dengan larutan avidin-HRP B untuk membentuk kompleks imun. Enzim yang tidak terikat pasca inkubasi dibersihkan dengan cara dibilas kemudian ditambahkan substrat solution D. Larutan yang didapat akan berubah menjadi biru, berubah lagi menjadi kuning akibat efek asam.²⁷

2.2. Interleukin 6 (IL-6)

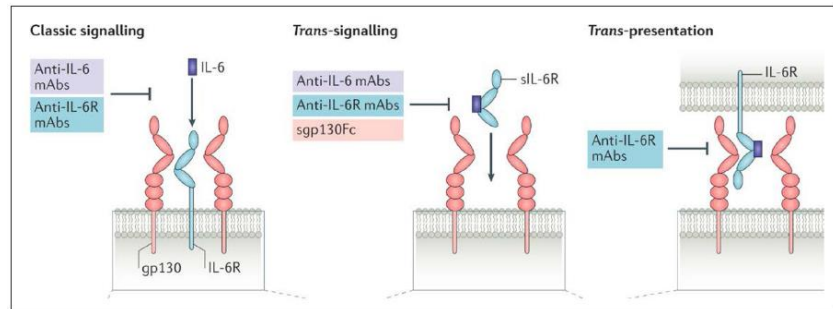
2.2.1. Definisi

IL-6 adalah sitokin proinflamasi penting dari imunitas bawaan yang secara fisiologis memiliki fungsi berkaitan dengan pertahanan, regulasi sel imun, proliferasi dan diferensiasi.²⁸ IL-6 diproduksi oleh sel T, sel B, hepatosit, sel endotel, fibroblas, keratinosit, sel mesangial, adiposit dan terutama oleh makrofag dan monosit.²⁹ IL-6 diproduksi sebagai respon terhadap peradangan, angiotensin II, stres oksidatif dan cedera vaskular. IL-6 akan meningkatkan jumlah trombosit darah perifer, menginduksi trombositosis, memodulasi relaksasi sel endotel, berperan dalam diferensiasi monosit vaskular dan memiliki banyak efek pada obesitas dan metabolisme. IL-6 menginduksi ekspresi faktor jaringan pada permukaan monosit disertai dengan peningkatan aktifitas prokoagulan monosit. Efek prokoagulan termasuk induksi PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type) sebagai respon fase akut serta regulasi yang mengarah pada keadaan protrombotik pada dinding vaskular, sehingga menyebabkan hilangnya fungsi penghalang endotel yang berkelanjutan.²⁸

2.2.2. Jalur Persinyalan IL-6

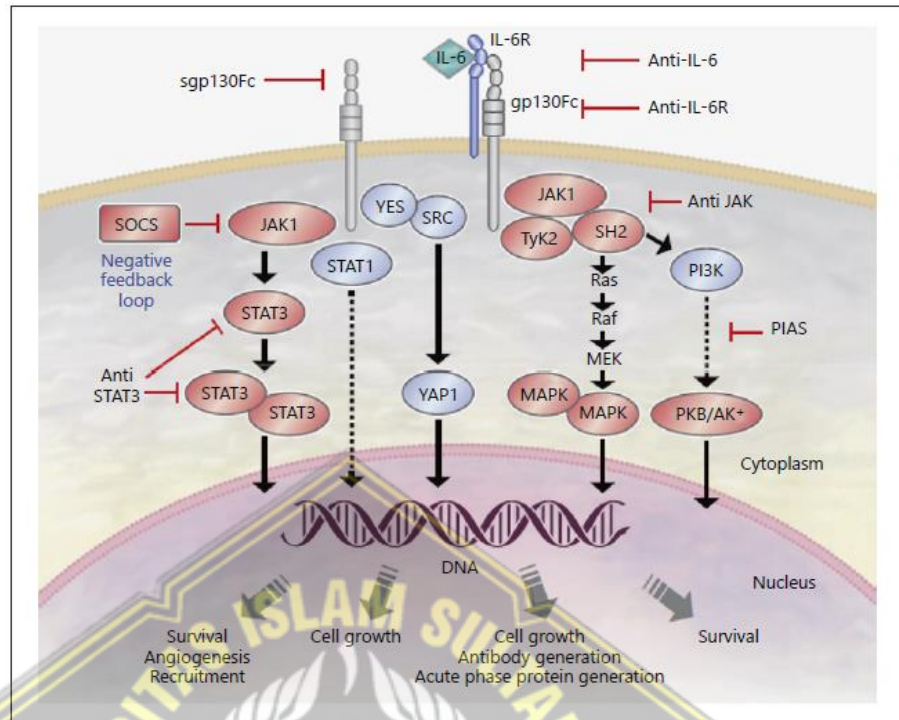
Jalur persinyalan IL-6 memiliki tiga mekanisme yaitu pertama jalur persinyalan “klasik”, terjadi ketika IL-6 yang disekresi berikatan

dengan IL-6R (IL-6 receptor) yang terikat membran dan membentuk kompleks IL-6R dengan dua subunit (IL-6R dan gp130).^{28,30} Kemudian kompleks IL-6R dan gp130 akan mengaktifkan persinyalan intraseluler.²⁸ Jalur persinyalan klasik dianggap sebagai mekanisme utama di mana IL-6 ikut mengatur berbagai proses homeostasis, termasuk metabolisme glukosa.³⁰ Jalur persinyalan IL-6 yang kedua dikenal sebagai persinyalan “trans” yang memediasi efek pro-inflamasi IL-6. IL-6 yang bersirkulasi akan berikatan dengan soluble IL-6R (sIL-6 R) dan memediasi aksi di semua sel yang mengekspresikan gp130 dan mengaktifasi persinyalan intraseluler dalam sel yang tidak mengekspresikan IL-6R itu sendiri.^{28,30} sIL-6 R dihasilkan dari pembelahan proteolitik IL-6R dengan metalloprotease ADAM10/17 pada membran sel yang bertanggung jawab atas pembelahan tersebut. ADAM 10/17 memainkan peran fisiologis utama dalam persinyalan “trans” IL-6, kemudian berkontribusi dalam regulasi imunitas bawaan, termasuk hematopoesis dan rekrutmen neutrofil melalui granulopoiesis. Selain itu, melalui jalur persinyalan “trans”, IL-6 memodifikasi aktivitas beberapa kumpulan sel T, sehingga mengatur bagian dari imunitas adaptif. Jalur persinyalan yang ketiga yaitu “trans-presentasi” di mana terjadi interaksi antigen spesifik antara sel dendritik yang menghadirkan IL-6 ke sel T .



Gambar 2. 1 Modalitas persinyalan IL-6²⁸

Jalur persinyalan tersebut akan mengaktifasi tirosin kinase Janus kinase 1,2 (JAK1,2) dan Tyk2 . JAK yang terikat pada sitoplasma gp130 akan memfosforilasi lima residu tirosin dan mengaktifasi jalur persinyalan intraseluler, termasuk jalur MAP kinase dan PI3 kinase dan jalur persinyalan transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Faktor transkripsi STAT3 direkrut dan diaktifkan oleh fosforilasi dan STAT1 juga mengalami sedikit aktifasi, kemudian fosforilasi ini akan memulai proses homodimerisasi dan transfer STAT3 ke dalam nukleus. Stimulasi jalur IL-6/JAK/STAT3 memediasi transkripsi beberapa gen yang terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, rekrutmen, kelangsungan hidup dan transformasi.²⁹



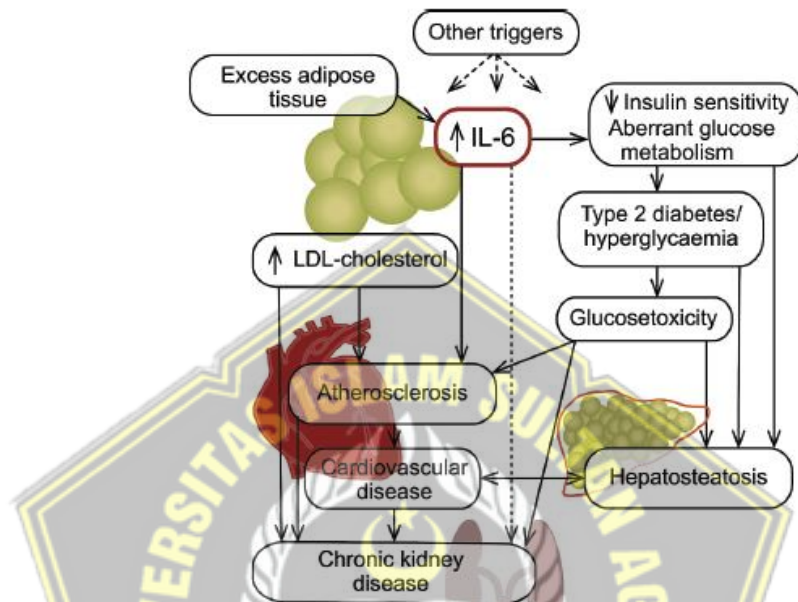
Gambar 2. 2 Aktivitas persinyalan IL-6²⁹

3. IL-6 dan Aterosklerosis

IL-6 tidak hanya dikenal sebagai sitokin proinflamasi tetapi juga sebagai hormon karena efek fisiologisnya yang beragam. Sintesis IL-6 berlangsung hampir di semua jenis sel, termasuk sel-sel kekebalan tubuh, menggambarkan sifat pleiotropik sitokin yang juga berperan dalam mengatur metabolisme, termasuk sensitivitas insulin, pengeluaran energi dan homeostasis lipid serta fungsi endotel, aktivitas saraf dan lainnya.³⁰

Kelebihan jaringan adiposa akan menyebabkan makrofag mengekspresikan IL-6 yang memicu oksidasi lemak, sehingga terjadi lipolisis. Peningkatan kadar IL-6 yang berlebihan juga menyebabkan gangguan pada metabolisme glukosa sehingga terjadi glukotoksisitas.

Peningkatan kolesterol dan glukosa menyebabkan penumpukan di pembuluh darah sehingga menyebabkan terjadinya aterosklerosis penyakit kardiovaskular dan penyakit ginjal kronis.³⁰



Gambar 2. 3 IL-6 pada gangguan metabolik³⁰

Aterosklerosis sebelumnya merupakan penyakit yang disebabkan pengendapan lipid yang diinduksi oleh diet tinggi lemak, namun saat ini didefinisikan juga sebagai penyakit yang terkait dengan peradangan kronis. Jalur persinyalan IL-6/IL-6R/STAT3 memainkan peran penting dalam proses peradangan tersebut. Respon inflamasi akibat IL-6 akan menyebabkan jejas pada endotelium, yang mendorong fibrinolisis dan berperan aktif dalam reaksi imun dan inflamasi. Integritas endotel yang terganggu menyebabkan proliferasi dan migasi

dari VSMC (Vascular Smooth Muscle), yang menyebabkan remodeling vaskular pada aterosklerosis.³¹

2.3. Hiperkolesterolemia

2.3.1. Definisi Hiperkolesterolemia

Hiperkolesterolemia merupakan kondisi di mana terjadi peningkatan kadar kolesterol darah dan yang menjadi salah satu faktor resiko terjadinya penyakit kardiovaskular, serebrovaskular dan penyakit vaskular perifer. Hiperkolesterolemia dapat disebabkan oleh penyebab primer (genetik atau familial) atau sekunder (didapat). Mutasi genetik gen reseptor LDL menyebabkan 85% penyebab familial. Faktor-faktor lain termasuk apolipoprotein B yang rusak proprotein convertase subtilisin/kexin tipe 9 mutasi fungsi gen, mutasi protein adaptor reseptor LDL dan HC poligenik. Penyebab yang didapat meliputi kondisi medis seperti hipotiroidisme, diabetes melitus, sindrom nefrotik, dan kolestasis. Obat-obatan tertentu seperti siklosporin dan diuretik thiazide, serta asupan kolesterol makanan yang berlebihan dan merokok berkaitan dengan peningkatan risiko hiperkolesterolemia.³²

Kolesterol dalam tubuh berasal dari dua sumber yaitu : disintesis secara de novo dalam sel tubuh atau diperoleh melalui konsumsi makanan. Kolesterol dikonsumsi oleh banyak orang walaupun sebenarnya tidak perlu mengkonsumsinya hanya untuk

mendapatkan kolesterol saja, karena sel-sel kita mampu memproduksi molekul ini dalam jumlah yang cukup untuk memenuhi kebutuhan tubuh. Kadar kolesterol dapat dipertahankan melalui pengaturan sintesis dan penyerapan yang berarti ketika jumlah kolesterol rendah maka sintesis dan penyerapan akan diregulasi dan jika asupan makanan tinggi, ekskresi akan meningkat dan laju sintesisnya akan menurun.³³

Hiperkolesterolemia adalah kondisi adanya kadar kolesterol yang tinggi dalam darah baik dalam bentuk hiperlipidemia dan hiperlipoproteinemia. Kadar kolesterol darah normal pada manusia jika $< 200\text{mg/dl}$, dikatakan border line jika diantara $200 - 239\text{ mg/dl}$ dan peningkatan kadar kolesterol $\geq 240\text{ mg/dl}$ dapat dikatakan sebagai hiperkolesterolemia. Kolesterol bersifat tidak larut air sehingga diangkut dalam plasma darah dalam partikel protein (lipoprotein). Lipoprotein diklasifikasikan berdasarkan densitasnya yaitu VLDL, IDL, LDL, dan HDL. Semua lipoprotein membawa kolesterol tetapi peningkatan lipoprotein selain HDL (kolesterol non HDL), khususnya kolesterol LDL dikaitkan dengan resiko aterosklerosis dan penyakit jantung koroner. Sebaliknya kadar kolesterol HDL yang lebih tinggi memiliki sifat protektif. Peningkatan kolesterol non HDL dan LDL dalam darah dapat disebabkan oleh pola makan, penyakit bawaan (genetik) obesitas, atau adanya penyakit lain seperti penyakit tiroid.³²

2.3.2. Metabolisme Kolesterol

Lemak diabsorpsi dari diet dan lipid disintesis di hati dan jaringan adiposa, kemudian diangkut pada berbagai jaringan dan organ untuk pemanfaatan dan penyimpanan. Lipid bersifat tidak larut air sehingga dalam plasma darah pengangkutan terjadi dengan menghubungkan nonpolar lipid (triasilgliserol dan ester kolesterol) dengan amfipatik lipid (fosfolipid dan kolesterol) dan protein untuk dibuat lipoprotein yang larut dalam air. Lipid plasma terdiri dari triasilgliserol (16%), fosfolipid (30%), kolesterol (14%), dan ester kolesterol (36%) dan fraksi yang jauh lebih kecil dari asam lemak rantai panjang yang tidak teresterifikasi (atau FFA) (4%). Fraksi terakhir ini, FFA, secara metabolik merupakan lipid plasma yang paling aktif. Lipoprotein memiliki empat kelompok utama yang telah diidentifikasi yang penting secara fisiologis dan dalam diagnosis klinis yaitu :

- a. kilomikron, bersumber dari penyerapan usus triasilgliserol dan lipid lainnya;
- b. VLDL, berasal dari hati untuk ekspor triasilgliserol;
- c. LDL, bertanggung jawab untuk pengangkutan kolesterol pada manusia dan mewakili tahap akhir dalam katabolisme VLDL; dan
- d. HDL, terlibat dalam membalikkan transportasi kolesterol dan metabolisme VLDL dan kilomikron.

Triasilgliserol adalah lipid dominan dalam kilomikron dan VLDL, sedangkan kolesterol dan fosfolipid merupakan lipid utama pada LDL

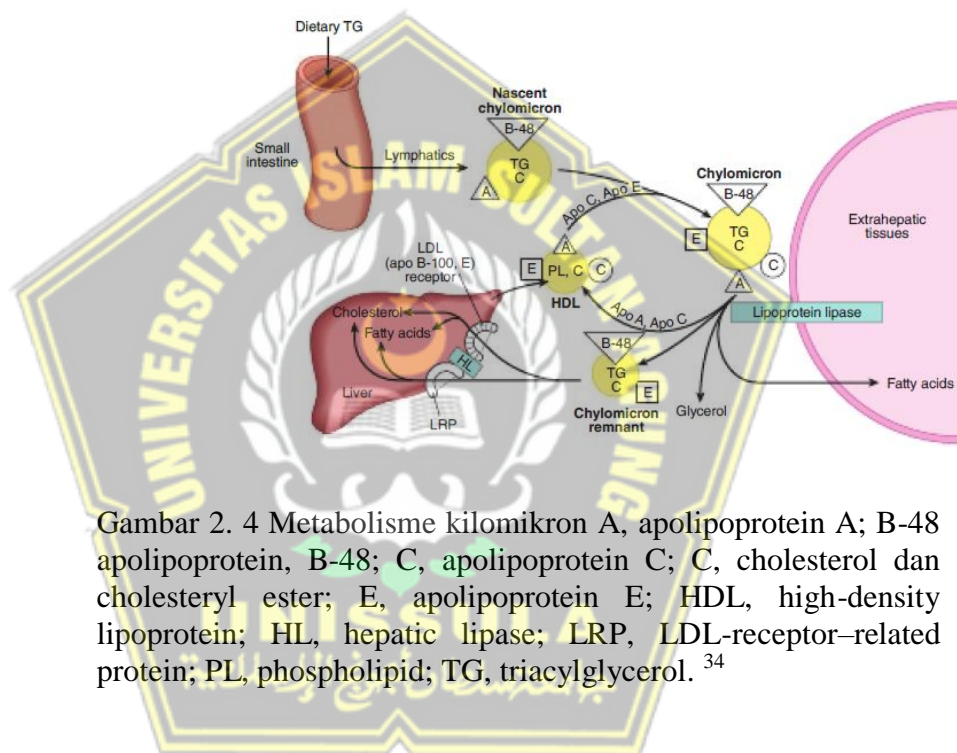
dan HDL. Lipoprotein mungkin juga diklasifikasikan menurut sifat elektroforesisnya menjadi α - (HDL), β - (LDL), dan pre- β (VLDL)-lipoprotein.³⁴

1. Jalur Eksogen

Kandungan lipid yang terbanyak dalam makanan adalah trigliserida dan sejumlah kecil fosfolipid, kolesterol, dan ester kolesterol. Lipid akan mengalami emulsifikasi oleh empedu menjadi partikel kecil di lambung. Trigliserida di hidrolisis di usus oleh lipase pancreas dan lipase usus menghasilkan asam lemak bebas dan monogliserida. Asam lemak bebas dan monogliserol bersama empedu dalam bentuk miselus masuk ke *brush border* enterosit untuk diserap. Empedu dilepas kembali dan didaur ulang dalam proses pengangkutan. Dalam enterosit, asam lemak bebas akan diubah lagi menjadi trigliserida, sedangkan kolesterol akan mengalami esterifikasi menjadi kolesterol ester, keduanya bersama dengan fosfolipid akan membentuk lipoprotein yang disebut kilomikron *nascent*.³⁵

Kilomikron mengangkut trigliserid dan kolesterol dari dalam enterosit melalui sirkulasi limfatik. Di dalam kapiler adiposa dan jaringan otot, apoprotein C-II (apo C-II) pada kilomikron mengaktifkan lipoprotein lipase (LPL) endotel untuk mengubah 90% trigliserida kilomikron menjadi asam lemak dan gliserol, yang diambil oleh adiposit dan sel otot untuk penggunaan atau

penyimpanan energi. Sisa-sisa kilomikron yang kaya kolesterol kemudian bersirkulasi kembali ke hati, di mana mereka dibersihkan dalam proses yang dimediasi oleh apoprotein E (apo E).³⁴ Bila asam lemak bebas terdapat dalam jumlah besar, sebagian akan diambil oleh hati menjadi bahan pembentuk trigliserida.³⁵

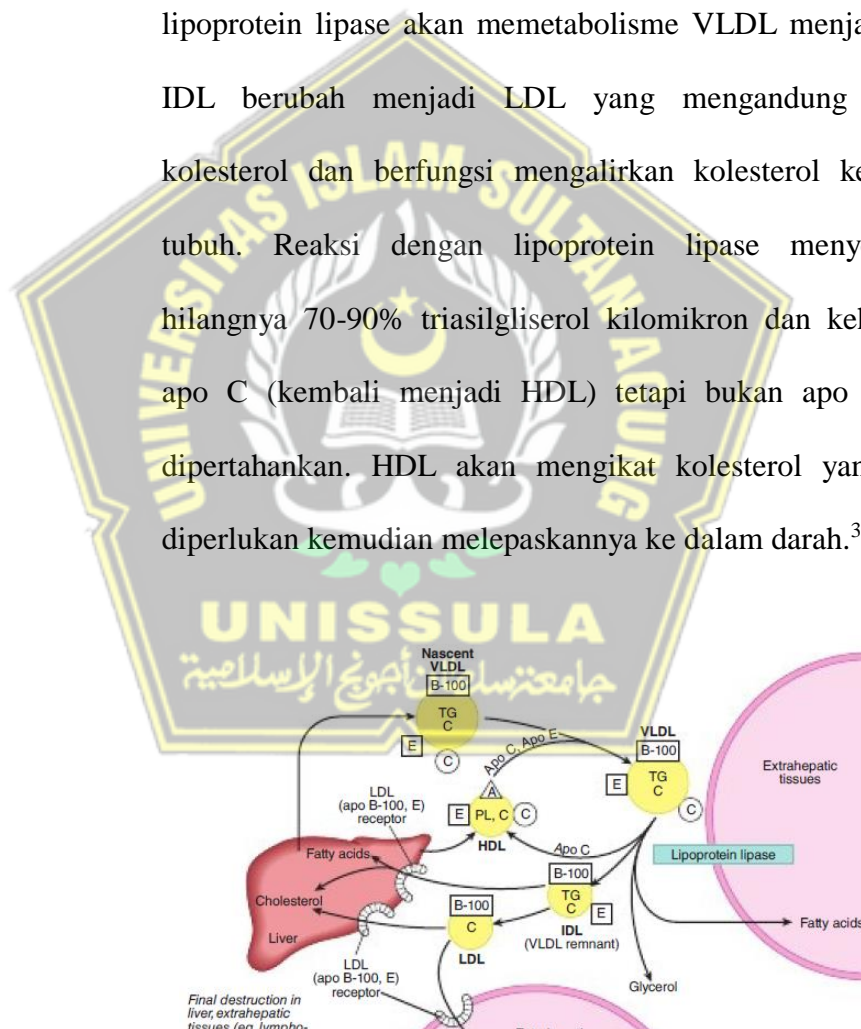


Gambar 2. 4 Metabolisme kilomikron A, apolipoprotein A; B-48 apolipoprotein, B-48; C, apolipoprotein C; C, kolesterol dan cholesteryl ester; E, apolipoprotein E; HDL, high-density lipoprotein; HL, hepatic lipase; LRP, LDL-receptor-related protein; PL, phospholipid; TG, triacylglycerol. ³⁴

2. Jalur Endogen

Karbohidrat akan menjadi asam lemak kemudian membentuk trigliserida di hati. Trigliserida dialirkan melalui aliran darah dalam bentuk VLDL kemudian disirkulasikan ke otot dan jaringan adipose. Reseptor VLDL berperan dalam pengiriman asam lemak dari VLDL triasilgliserol ke adiposit dengan mengikat VLDL dan membawanya untuk memiliki

kontak yang dekat dengan lipoprotein lipase. Pada jaringan adiposa insulin meningkatkan sintesis lipoprotein lipase dalam adiposit dan translokasi pada permukaan lumen dari kapiler endotelium. Fosfolipid dan apo C-II diperlukan sebagai kofaktor untuk aktifitas lipoprotein lipase, sedangkan apo A-II dan dan apo C-III bertindak sebagai inhibitor. Enzim lipoprotein lipase akan memetabolisme VLDL menjadi IDL. IDL berubah menjadi LDL yang mengandung banyak kolesterol dan berfungsi mengalirkan kolesterol ke dalam tubuh. Reaksi dengan lipoprotein lipase menyebabkan hilangnya 70-90% triasilgliserol kilomikron dan kehilangan apo C (kembali menjadi HDL) tetapi bukan apo E yang dipertahankan. HDL akan mengikat kolesterol yang tidak diperlukan kemudian melepaskannya ke dalam darah.^{34,35}

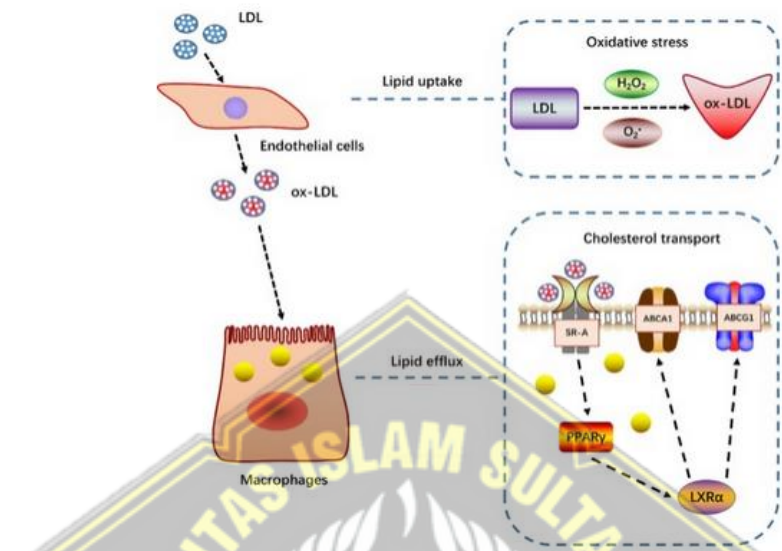


Gambar 2. 5 Metabolisme VLDL, IDL dan LDL. A, apolipoprotein A; B-100, apolipoprotein B-100; C, apolipoprotein C; C, kolesterol and cholesteryl ester; E, apolipoprotein E; HDL, high-density lipoprotein; IDL, intermediate-density lipoprotein; PL, phospholipid; TG, triacylglycerol.³⁴

3. Metabolisme Intraseluler Kolesterol

Makrofag yang menyerap sisa-sisa LDL atau lipoprotein asli dan termodifikasi dan berdiferensiasi menjadi sel busa yang memainkan peran penting dalam pembentukan plak dan dapat menyebabkan gangguan plak aterosklerotik. Pembentukan sel busa melibatkan terjadinya ketidakseimbangan antara penyerapan kolesterol, metabolisme intraseluler, dan penghabisan kolesterol. Transporter utama yang bertanggung jawab terhadap penghabisan kolesterol ada tiga yaitu : (1) *scavenger receptor B1* (SR-B1) dan *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1), yang berperan dalam penghabisan HDL matur dan *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) yang mengatur penghabisan menjadi *lipid-free apoA-I*. ABCA1 mengatur lebih dari 50% penghabisan kolesterol makrofag, dan pada plak stadium lanjut, ekspresi ABCA1 menurun yang menyebabkan penurunan penghabisan kolesterol sebesar 80%. Gen ABCG1 dan ABCA1 diatur secara langsung oleh reseptor X hati (LXR) dan penelitian in vivo dan in vitro yang ekstensif berfokus pada bagaimana LXR α dan LXR β menginduksi ABCG1 dan ABCA1 dan, melalui mekanisme ini dan mekanisme lainnya, mendorong regresi lesi sel busa. Kemudian akan terjadi aktivasi PPAR γ , reseptor nuklir dan faktor transkripsional multifungsi yang mengatur tingkat ekspresi gen dalam metabolisme glukosa dan lipid dalam jaringan adiposa. PPAR γ juga

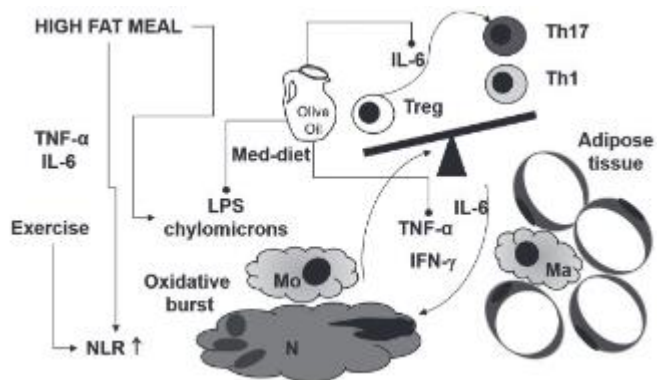
diekspresikan pada sel lainnya seperti hepatosit, makrofag dan sel busa.³⁶



Gambar 2. 6 Metabolisme intraseluler kolesterol³⁶

2.3.3. Hubungan Diet Tinggi Lemak dengan TNF- α dan IL-6

Asupan makanan dan BMI akan mempengaruhi pengangkutan lipopolisakarida (LPS) yang dimediasi oleh kilomikron dan endotoksemia yang berkontribusi terhadap timbulnya peradangan kronis tingkat rendah dan patogenesis penyakit metabolik. Kelebihan berat badan dan obesitas juga menyebabkan peningkatan lipemia post prandial, endotoksemia dan aktivitas sel polimorfonuklear. Adiposit pada jaringan adiposa akan mengkativasi makrofag sehingga menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi TNF- α dan IL-6 yang berperan penting dalam induksi diferensiasi IR dan pembentukan keseimbangan sel Th17/regulator T(Treg) dan hipertensi.³³



Gambar 2. 7 Diet tinggi lemak mempengaruhi TNF- α dan IL-6³³

Diet tinggi lemak menyebabkan obesitas dan gangguan metabolisme yang dapat memicu peradangan kronis. Obesitas dapat menyebabkan disbiosis mikrobiota usus, di mana dalam kondisi normal 90% terdiri dari *Bakteroidetes* dan *Firmicutes* namun pada obesitas terjadi penurunan rasio *Bakteroidetes* dan *Firmicutes*. Lipopolisakarida (LPS) sebagai endotoksin pada dinding sel eksternal bakteri gram negatif dapat menimbulkan respon imun yang kuat. Disbiosis mikrobiota usus akan meningkatkan LPS yang akan ditransfer ke sistem peredaran darah mengakibatkan endotoksemia metabolik. Kadar LPS yang meningkat akan berinteraksi dengan TLR4 sel inang dan menyebabkan peningkatan ekspresi faktor proinflamasi meliputi TNF- α dan IL-6. Obesitas juga dapat merusak integritas epitel penghalang usus akibat adanya peningkatan permeabilitas usus yang meningkat karena aktivasi TLR4.³³

2.4.Habbatussauda (*Nigella sativa*)

2.4.1. Klasifikasi Tumbuhan

Klasifikasi habbatussauda berdasarkan ilmu taksonomi tumbuhan ³⁷ :

Kingdom : *Plantae*
Sub Kingdom : *Traceabionta*
Sub Divisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida-dicotyledon*
Sub Kelas : *Magnoliidae*
Ordo : *Ranunculales*
Famili : *Ranunculaceae (buttercup)*
Genus : *Nigella L*
Species : *Nigella sativa*

Habbatussauda (*Nigella sativa*) atau jintan hitam di Timur Tengah maupun Asia Tengah dan Timur dikenal sebagai obat alami untuk berbagai penyakit yang terdapat dalam hadist , sebagai berikut ³⁸:

حَدَّثَنَا عَبْدُ اللَّهِ بْنُ أَبِي شَيْبَةَ حَدَّثَنَا عُبَيْدُ اللَّهِ حَدَّثَنَا إِسْرَائِيلُ عَنْ مَنْصُورٍ عَنْ خَالِدِ بْنِ سَعْدٍ قَالَ : خَرَجْنَا وَمَعَنَا غَالِبُ بْنُ أَبَجَرَ فَمَرِضَ فِي الطَّرِيقِ فَقَدِمْنَا الْمَدِينَةَ وَهُوَ مَرِيضٌ فَعَادَهُ ابْنُ أَبِي عَتِيقٍ فَقَالَ لَنَا : عَلَيْكُمْ هَذِهِ الْحَبَّةُ السَّوْدَاءُ فَخَذُوا مِنْهَا خَمْسًا أَوْ سَبْعًا فَاسْحَقُوهَا ثُمَّ اقْطُرُوهَا فِي أَنْفِهِ بِقَطْرَاتِ زَيْتٍ فِي هَذَا الْجَانِبِ وَفِي هَذَا الْجَانِبِ فَإِنَّ عَائِشَةَ حَدَّثَتْنِي أَنَّهَا سَمِعَتْ النَّبِيَّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ يَقُولُ : إِنَّ هَذِهِ الْحَبَّةَ السَّوْدَاءَ شِفَاءٌ مِنْ كُلِّ دَاءٍ إِلَّا مِنَ السَّامِ قُلْتُ وَمَا السَّامُ قَالَ الْمَوْتُ.

“Telah menceritakan kepada kami Abdullah bin Abu Syaibah telah menceritakan kepada kami 'Ubaidullah telah menceritakan kepada kami Isra`il dari Manshur dari Khalid bin Sa'd dia berkata; Kami pernah bepergian yang di antaranya terdapat Ghalib bin Abjar, di tengah jalan ia jatuh sakit, ketika sampai di Madinah ia masih menderita sakit, lalu Ibnu Abu 'Atiq menjenguknya dan berkata kepada kami; "Hendaknya kalian memberinya habbatus sauda' (jintan hitam), ambillah lima atau tujuh biji, lalu tumbuklah hingga halus, setelah itu teteskanlah di hidungnya di sertai dengan tetesan minyak sebelah sini dan sebelah sini, karena sesungguhnya Aisyah pernah menceritakan kepadaku bahwa dia mendengar Nabi shallallahu 'alaihi wasallam bersabda: "Sesungguhnya habbatus sauda' ini adalah obat dari segala macam penyakit kecuali saam." Aku bertanya; "Apakah saam itu?" beliau menjawab: "Kematian."(HR. Bukhari: 5255).

2.4.2. Kandungan

Bagian habbatussauda yang berkhasiat adalah kandungan kimia dalam bijinya.³⁷ *Nigella sativa* telah dilaporkan mengandung lebih dari 100 senyawa kimia dan banyak melaporkan efek terapeutik akibat senyawa tersebut. *Nigella sativa oil* mengandung rata-rata 35,6%–41,6% lemak (minyak konstan), 22,7% protein, 32% karbohidrat, dan 0,5%–1,6% asam lemak esensial. Asam lemak utama dalam tanaman ini adalah asam linoleat (sekitar 57,3% minyak tetap). Tanaman ini juga mengandung senyawa lain seperti serat kasar, gula pereduksi, getah,

resin, alkaloid, sterol, tanin, flavonoid, saponin, mineral (seperti Fe, seng, Na, fosfor, dan kalsium), dan vitamin (C, B1, B3, B6, dan B9 sebagai vitamin yang larut dalam air dan A dan E sebagai pasangan vitamin yang larut dalam lemak). Aktivitas biologis *Nigella sativa* disebabkan oleh proporsi komponen pembentuk berikut: minyak atsiri, seperti timokuinon (TQ) (30%–48%), *P-cymene* (7%–15%), *carvacrol* (6%–12%), *4-terpineol* (2%–7%), *trans-anethole* (1%–4%), dan *sesquiterpene longifolene* (1%–8%). Kombinasi empat *monoterpen* (*d-limonene* (*carvone*), *carvone*, *pinene- α* , dan *p-cymene*), TQ, dan turunannya merupakan senyawa yang paling aktif secara farmakologis.¹⁰

Komponen utama dalam biji habbatussauda yaitu *thymoquinone* (lebih dari 50%). *Thymoquinone* merupakan suatu zat aktif yang berfungsi memproteksi melawan hepatotoksisitas dan nefrotoksisitas, berperan sebagai antiinflamasi, analgesik, antipiretik, antimikroba, dan melindungi sel tubuh dari stress oksidasi serta menekan produksi radikal bebas.³⁹ Habbatussauda juga memiliki aktivitas biologis lainnya seperti antidiabetes, antihipertensi, dan hipolipidemik.¹⁰

2.4.3. Manfaat

2.4.3.1. Anti-hiperkolesterolemia

Nigella sativa oil dapat mempengaruhi profil lipid karena efek agonisnya terhadap PPAR- γ dan meningkatkan regulasi Reseptor

LDL di hepatosit sehingga terjadi pembuangan kolesterol, dan penekanan *gen* HMG-CoA R dan kolesterol sintase.¹⁰

2.4.3.2. Antioksidan

Nigella sativa memiliki banyak khasiat terutama disebabkan oleh kadungan kuinon yang dikenal juga tymoquinone. Tymoquinone memiliki efek pemusnahan dan penghambatan terhadap stres oksidatif.⁴¹ Tymoquinone dapat menghamat stres oksidatif dengan meningkatkan kadar enzim antioksidan seperti ADA, CAT, GSH, GSH-ST, GPx, dan SOD. Kemudian juga dapat menurunkan ROS/NOS, *malonilealdehyde* (MDA), *conjugated diene* (CGD), *lipid peroxidase* (LPO), dan *myloperoxidase* (MPO).

¹⁰

Nigella sativa menggunakan sifat antioksidannya melalui mekanisme antioksidan langsung dan tidak langsung serta menghambat ekspresi enzim penghasil oksidatif (inducible NO synthase [iNOS]). Aktivitas antioksidan langsung *Nigella sativa* dapat memulihkan antioksidan lain termasuk GSH, Vitamin E dan Vitamin A, pengkelat logam, dan scavenger radikal bebas (ROS dan RNS). *Nigella sativa* juga menjalankan peran antioksidan tidak langsungnya dengan mengaktifkan faktor transkripsi yang terlibat dalam ekspresi enzim antioksidan termasuk SOD, glutathione S-transferases (GSH-ST), GPX, dan CAT.¹⁰

2.4.3.3. Anti-inflamasi

Nigella sativa memiliki efek anti-inflamasi dengan menghambat jalur NF- κ B. NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang menyebabkan eksaserbasi status inflamasi. Faktor transkripsi ini terdapat dalam sitosol dan memiliki dua subunit yang disebut P50 dan P65. NF- κ B juga berikatan dengan inhibitor protein penghambat κ B (I κ B α). Faktor-faktor seperti ROS, TNF α , *interleukin-1 beta* (IL-1B), dan bakteri lipopolisakarida (LPS) menginduksi aktivitas NF- κ B. Faktor-faktor ini melalui aktivasi I κ B kinase (IKK) menghasilkan fosforilasi dan penghancuran I κ B α yang menghasilkan aktivasi NF- κ B dan transfernya ke nukleus. NF- κ B terletak di dalam inti pada sekuens gen tertentu yang pada akhirnya akan menyebabkan peningkatan ekspresi berbagai jenis sitokin inflamasi (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , dan MMP3), COX-2, dan iNOS. Sitokin inflamasi ini tidak hanya diregulasi oleh NF- κ B tetapi juga mengaktifkan NF- κ B yang menyebabkan kontinuitas status inflamasi. Oleh karena itu, *Nigella sativa* mungkin dapat memutus interaksi ini dengan penekanan NF- κ B dan memainkan peran penting dalam aktivitas antiinflamasi. Penghambatan jalur NF- κ B oleh *Nigella sativa* dapat dilakukan dengan beberapa cara: (1) mencegah transfer NF- κ B dari sitosol ke nukleus, (2) memblokir subunit NF- κ B P50 yang berikatan dengan promotor gen yang mengekspresikan faktor inflamasi terutama TNF- α , (3)

penghambatan ekspresi inti subunit NF- κ B p65, dan (4) pencegahan fosforilasi dan degradasi I-KB α (pengikatan I-KB α ke NF- κ B menyebabkan inaktivasi faktor transkripsi ini).¹⁰



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

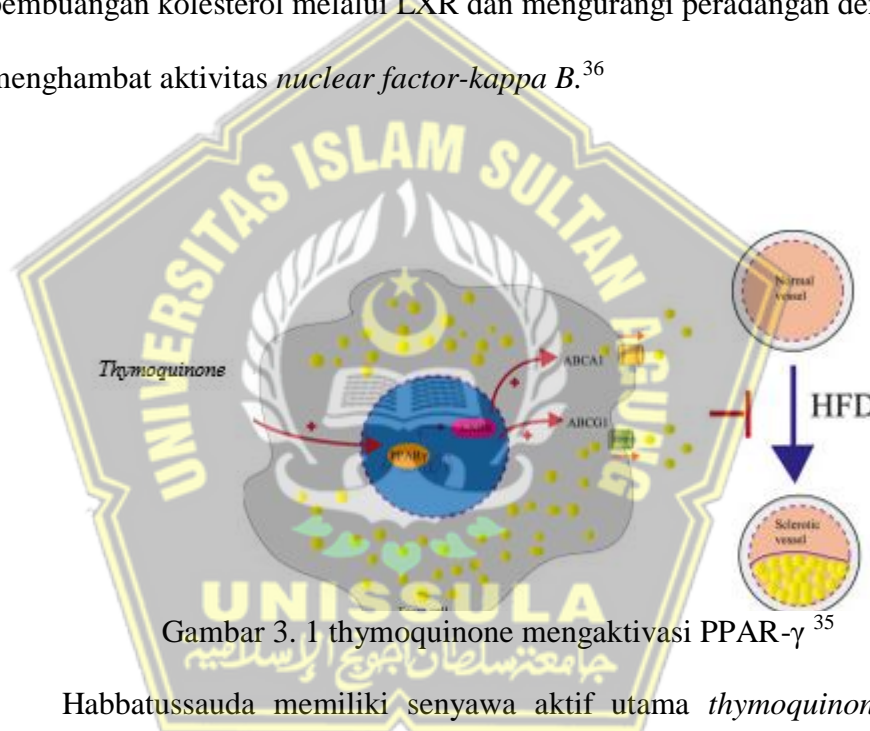
3.1. Kerangka Teori

Diet tinggi lemak dapat meningkatkan kadar glukosa darah dan asam lemak bebas sehingga terjadi peningkatan sintesis lipid dan penumpukan diacylglycerol di hati dan aktivasi protein kinase C ϵ (PKC ϵ). Peningkatan pelepasan asam lemak bebas dari adiposit ke dalam darah yang mengaktifkan protein kinase C selanjutnya mempengaruhi ekspresi inhibitor kappa β kinase, c-Jun N-terminal kinases (JNK) dan p38 mitogen-activated-protein-kinases, merangsang pelepasan faktor inflamasi seperti TNF- α dan IL-6 dan menyebabkan respon inflamasi internal.⁴²

Diet tinggi lemak juga dapat mengubah komposisi mikrobiota usus dengan mengurangi keanekaragaman mikroba dan mengurangi mikroba pengurai serat sehingga meningkatkan resiko obesitas. Peningkatan jumlah bakteri Enterobacteriaceae menyebabkan lipid A LPS bereaksi kuat terhadap TLR-4 pada jaringan usus menyebabkan respon inflamasi melalui aktivasi jalur persinyalan TLR-4/MyD88/NF-kB. Aktivasi jalur tersebut menyebabkan respon peradangan berupa peningkatan permeabilitas vaskular pada usus dan peningkatan kadar TNF- α dan IL-6 serum.⁴²

Diet tinggi lemak mempengaruhi pembentukan sel busa dengan melibatkan terjadinya ketidakseimbangan antara penyerapan kolesterol, metabolisme intraseluler, dan penghabisan kolesterol. Transporter utama yang bertanggung jawab terhadap penghabisan kolesterol ada tiga yaitu :

scavenger receptor B1 (SR-B1) dan *ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)*, yang berperan dalam penghabisan HDL matur dan *ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)* yang mengatur penghabisan menjadi *lipid-free apoA-I*. Gen *ABCG1* dan *ABCA1* diatur secara langsung oleh *liver X receptor (LXR)*. Selanjutna akan mengaktivasi *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)* dan mendorong pembuangan kolesterol melalui *LXR* dan mengurangi peradangan dengan menghambat aktivitas *nuclear factor-kappa B*.³⁶



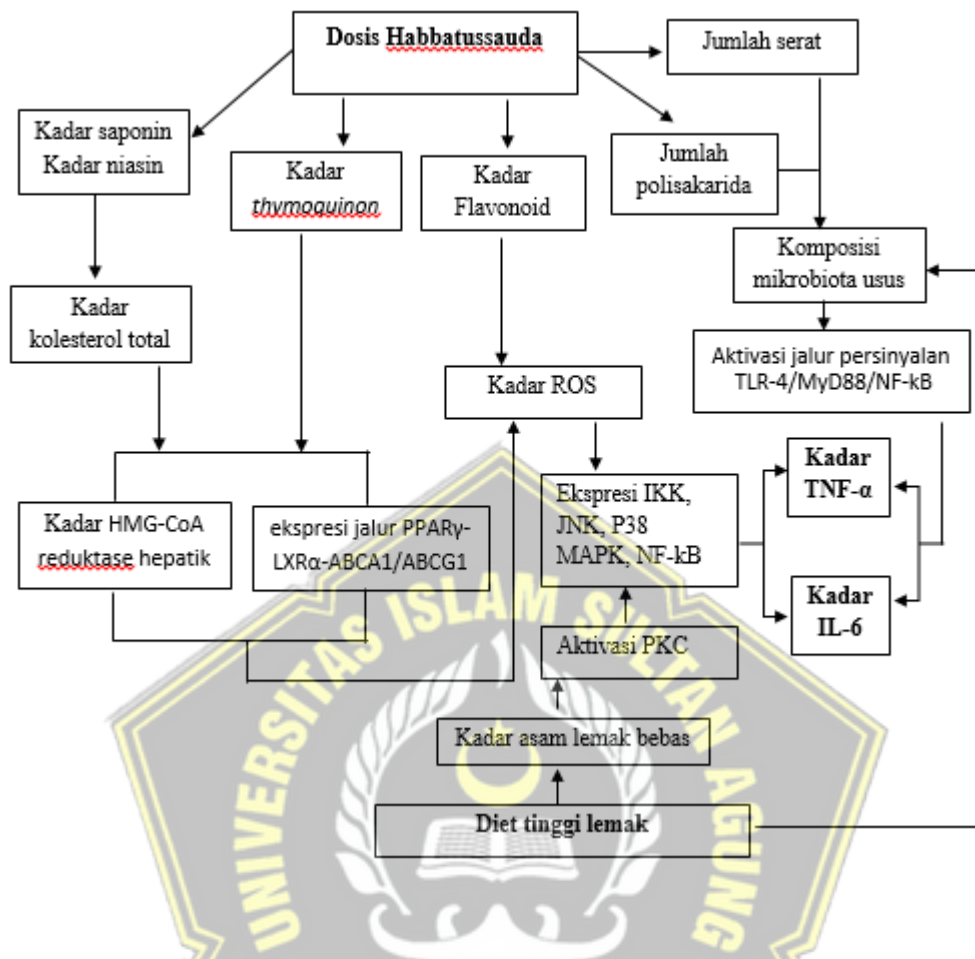
Gambar 3. 1 thymoquinone mengaktivasi PPAR- γ ³⁵

Habbatussauda memiliki senyawa aktif utama *thymoquinone* yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Aktivitas antioksidan *thymoquinone* tersebut berkaitan dengan efek hipolipidemik melalui penurunan peroksidasi dan peningkatan metabolisme lipid.⁴³ Sifat antioksidan *thymoquinone* ditunjukkan dengan penurunan kadar MDA, oxLDL serta fibronectin.⁴⁴ *Thymoquinone* dapat menurunkan kadar trigliserida dengan cara menurunkan aktivitas HMG-CoA reduktase hepatic, meningkatkan aktivitas arilesterase, mengatur gen-gen yang mempengaruhi

metabolisme kolesterol dan menurunkan stress oksidatif.⁴⁵ *Thymoquinone* juga dapat memiliki efek agonis terhadap PPAR- γ dan meningkatkan regulasi Reseptor LDL di hepatosit sehingga terjadi pembuangan kolesterol, dan penekanan *gen* HMG-CoA R dan kolesterol sintase.¹⁰

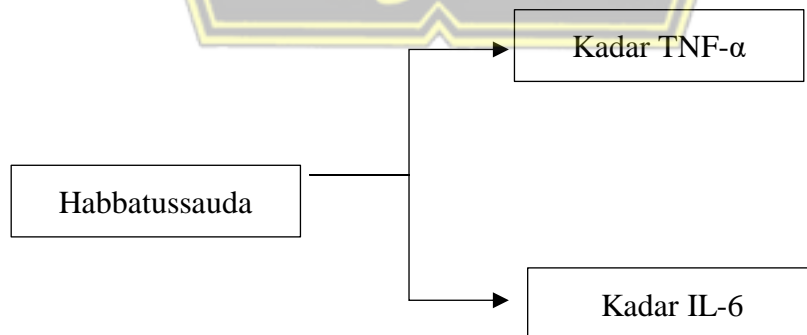
Thymoquinone dengan sifat antiobesitas juga bertindak memodifikasi hormon tiroid sehingga menyebabkan peningkatan tingkat metabolik basal dan penggunaan energi. Habbatussauda juga kaya dengan serat terlarut sehingga berefek pada rasa kenyang.⁴³ Serat kasar yang terkandung pada habbatussauda juga membantu menurunkan absorpsi lipid, meningkatkan sintesis asam empedu primer dan pelepasan tinja.⁴⁶ Asupan serat dapat meningkatkan keanekaragaman mikrobiota usus dan produksi SCFA di usus besar, sehingga dapat meningkatkan laju metabolisme dan termogenesis.⁴²

Obesitas merepresentasi kelebihan makronutrisi pada jaringan adiposa sehingga menyebabkan stimulasi pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan menurunkan produksi adiponektin, dua faktor yang menjadi penyebab kondisi proinflamasi serta stres oksidatif. *Thymoquinone* berpengaruh pada hiperplasia adiposit sehingga meningkatkan jumlah adiposit berukuran kecil yang merupakan sel-sel adiposit sensitif insulin yang mampu memproduksi adiponektin.⁴⁷ Adiponektin bertindak langsung dengan cara menurunkan respon inflamasi yang melibatkan TNF- α .⁴⁸



Gambar 3. 2 Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3. 3 Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

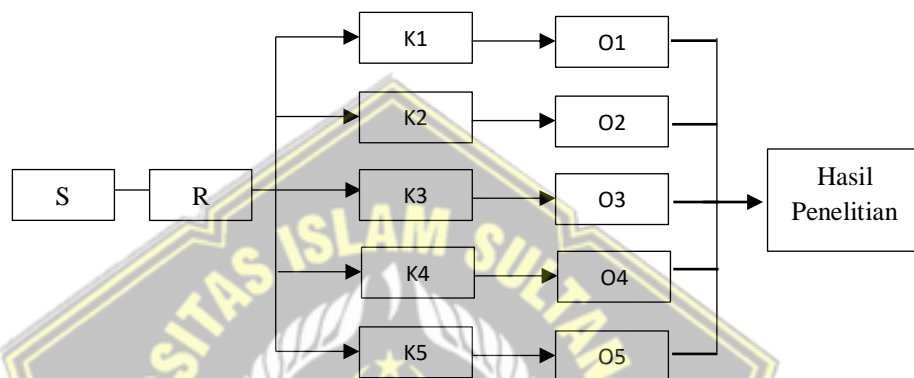
Hipotesis penelitian ini adalah habbatussauda berpengaruh terhadap penurunan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diberi diet tinggi lemak.



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.



Gambar 4. 1 Skema Rancangan Penelitian Postest Only Control Group

Keterangan :

- S = Sampel
- R = Randomisasi Sederhana
- K1 = Kontrol Normal (tanpa perlakuan)
- K2 = Kontrol Negatif (perlakuan diet tinggi lemak)
- K3 = Perlakuan diet tinggi lemak dan habbatussauda dosis 0,001 mL/ gBB
- K4 = Perlakuan diet tinggi lemak dan habbatussauda dosis 0,002 mL/ gBB
- K5 = Perlakuan diet tinggi lemak dan habbatussauda dosis 0,004 mL/ gBB
- O1= Hasil pengamatan K1 pada hari ke-45
- O2 = Hasil pengamatan K2 pada hari ke-45
- O3 = Hasil pengamatan K3 pada hari ke-45
- O4 = Hasil pengamatan K4 pada hari ke-45
- O5 = Hasil pengamatan K5 pada hari ke-45

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi dan sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih galur wistar berjenis kelamin jantan. Tikus dipelihara di ruangan dengan ventilasi cukup, dan suhu ruangan 28-32°C di laboratorium. Tikus putih galur wistar diberi makanan pellet dan minuman air putih secukupnya. Sebelum dilakukan perlakuan tikus galur wistar diadaptasi dalam kandang selama 1 minggu dan diberi perlakuan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR).

4.2.1.1 Kriteria inklusi

- a. Tikus galur wistar jantan
- b. Umur 6-8 minggu
- c. Berat badan 150 – 200 gram
- d. Tikus aktif

4.2.1.2 Kriteria eksklusi

Tikus dengan kecacatan anatomis

4.2.2.1 Kriteria Drop Out

Tikus yang mati saat penelitian sedang berlangsung

4.2.2. Besar sampel

Besar sampel yang diperlukan menggunakan rumus Federer,⁴⁹

dengan rumus :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \sim 5$$

Keterangan : t = Banyaknya perlakuan

n = Banyaknya sampel setiap perlakuan

Dari rumus didapatkan besar sampel untuk tiap perlakuan minimal 5 ekor tikus dan sebagaiantisipasi drop out ditambahkan 1 ekor sebagai cadangan, sehingga total dibutuhkan sebanyak 30 ekor tikus jantan wistar sebagai sampel penelitian.

4.2.3 Teknik *Sampling*

Tikus diadaptasi 1 minggu sebelum diberi perlakuan. Semua tikus memenuhi kriteria dimasukkan dalam sampel penelitian. Sebanyak 30 ekor tikus wistar jantan diberi diet tinggi lemak selama 30 hari, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara random dengan cara memberikan nomor urut pada tikus, kemudian membuat gulungan kertas sebanyak 30 buah berisi nomor 1 sampai dengan 30, dilanjutkan dengan melakukan undian dengan cara mengeluarkan 6 nomor selama

4 kali untuk kelompok K1, K2, K3 dan K4 serta sisanya untuk kelompok K5.

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

4.3.1.1 Variabel Bebas

Dosis habbatussauda

4.3.1.2 Variabel Terikat

Kadar IL-6 dan kadar TNF- α

4.3.1.3 Variabel Prakondisi

Diet tinggi lemak

4.4. Definisi operasional

4.4.1. Dosis Habbatussauda

Habbatussauda yang digunakan adalah merek Habbasyifa Oil dengan kemurnian 100% yang sudah memiliki standar pembuatan dan terdaftar BPOM dengan nomer POM TR 113 323 461 dan sertifikat halal MUI No.00140016360701. Satu botol mengandung 250 mL minyak habbatussauda. Dosis minyak habbatussauda yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 1 mL/kg (0,001 mL/gBB/hari), 2 mL/kg (0,002 mL/gBB/hari), dan 4 mL/kg (0,004 mL/gBB/hari). Pemberian minyak habbatussauda dilakukan pada hari ke 32-45 penelitian atau selama 14 hari dengan cara sondase oral.

Skala: Ordinal

4.4.2. Kadar IL-6

Kadar IL-6 adalah kadar yang diambil dari serum hewan coba dari bagian plexus retroorbitalis pada mata sebanyak 0,5 mL, darah disentrifuse selama 15-20 menit, kemudian serum diperiksa dengan teknik *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm. Kadar IL- 6 memiliki satuan yaitu picogram per mililiter (pg/ mL).

Skala data : Rasio.

4.4.3. Kadar TNF- α

Kadar TNF- α adalah kadar yang diambil dari serum hewan coba dari bagian plexus retroorbitalis pada mata sebanyak 0,5 mL, darah disentrifuse selama 15-20 menit, kemudian serum diperiksa dengan teknik *enzym linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm. Kadar TNF- α memiliki satuan yaitu picogram per mililiter (pg/ mL).

Skala : Rasio

4.4.4. Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak terdiri dari campuran serbuk pakan tikus 68 g/100 g, minyak jagung 6 g/100 g, mentega 6 g/100 g, susu 20 g/100 g serta diberikan air minum selama 44 hari. Komposisi nutrisi terdiri dari karbohidrat 43 %/100 g, protein 17 %/100 g, lemak 40%/100 g, dengan total energi 414 kcal/100 g. Pakan diet tinggi lemak dicampur dengan mesin pembuat pellet dan diberikan dua kali sehari, sekali pemberian sebanyak 10% dari berat badan tikus secara *ad libitum*.

Skala : Ordinal

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Alat penelitian

4.5.1.1. Alat pemeliharaan tikus galur wistar jantan

1. Kandang tikus dengan ukuran 40 x 30 x 20 cm terbuat dari besi yang di dalamnya terdapat sekam untuk alas dilengkapi dengan tempat makanan dan minum standar.
2. Timbangan digital
3. Sarung tangan

4.5.1.2. Alat pengambilan sampel darah

1. Sarung tangan
2. Masker
3. Tabung ependrof
4. Jarum suntik
5. Pipa hematokrit

4.5.1.3. Alat pemeriksaan

1. Bak bedah
2. Tabung rekasi
3. Eppendorf
4. Pipet tetes
5. Mikro plate/well
6. Mikro pipet
7. Tip
8. Inkubator

9. Spektrofotometer ELISA Reader

4.5.2. Bahan penelitian

4.5.2.1 Tikus putih jantan galur wistar yang sesuai kriteria inklusi

4.5.2.2 Pakan tikus standar yang memiliki komposisi nutrisi karbohidrat 48,8 %/100 g, protein 21 %/100 g, lemak 3%/100 g, kalsium 0,8%/100 g , fosfor 0,4%/100 g , serat 5%/100 g, serta diberikan minum dengan total energi 306,2 kcal/100 g

4.5.2.3 Pakan diet tinggi lemak dibuat dari campuran serbuk pakan tikus 68 g/100 g, minyak jangung 6 g/100 g, mentega 6 g/100 g, susu 20 g/100 g serta diberikan air minum. Komposisi nutrisi karbohidrat 43 %/100 g, protein 17 %/100 g, lemak 40%/100 g, dengan total energi 414 kcal/100 g

4.5.2.4 Minyak Habbatussauda (*Nigella sativa L.*)

4.5.2.5 Serum darah tikus

4.5.2.6 Reagen Kolesterol FS 5x25mL/1x3m

4.5.2.7 Kit pemeriksaan kadar IL-6 khusus tikus

4.5.2.8 TNF- α Elisa Kit (BZ-08184670-EB)

4.6. Cara Penelitian dan Alur Kerja

4.6.1. Menyiapkan tikus jantan galur wistar 30 ekor yang memenuhi kriteria inklusi

4.6.2. Tikus dipelihara sebaik mungkin selama 1 minggu di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research (SCCR)*, sehingga dapat beradaptasi pada kondisi laboratorium sebelum diberi perlakuan.

4.6.3. Tikus diletakkan di kandang dengan ventilasi yang cukup dengan siklus terang-gelap normal (12:12), kelembaban $55 \pm 5\%$ dan suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, serta tikus dapat mengakses air dan makanan dengan mudah.

4.6.4. Tikus dipilih secara randomisasi dari populasi ke dalam 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus

4.6.5. Pemberian diet tinggi lemak

Tikus diberikan pakan diet tinggi lemak tiap harinya hingga selama 44 hari.¹¹

4.6.6. Penentuan dosis minyak habbatussauda

Dosis minyak habbatussauda yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 mL/kg BB atau sebanding dengan 0,002 mL/ gBB/hari. Berdasarkan metode *half dose* dan *double dose*, maka didapatkan 3 dosis minyak habbatussauda, yaitu 1 mL/kg (0,001 mL/ gBB/hari), 2 mL/kg (0,002 mL/ gBB/hari), dan 4 mL/kg (0,004 mL/ gBB/hari).^{50,51,52} Pemberian minyak habbatussauda dilakukan pada

hari ke 32-44 penelitian atau selama 14 hari dengan cara sondase oral.⁵³

Penelitian sebelumnya mengenai efek toksik *Nigella sativa* terhadap fungsi hepar tikus menunjukkan bahwa pemberian minyak habbatussauda secara oral hingga dosis 10 mL/kg pada tikus dan mencit tidak menyebabkan kematian atau perubahan signifikan enzim hati selama 12 minggu.⁵⁴ Sehingga dapat disimpulkan bahwa penentuan dosis tersebut dapat digunakan karena tidak menimbulkan efek toksik.

4.6.7. Teknik pengambilan darah

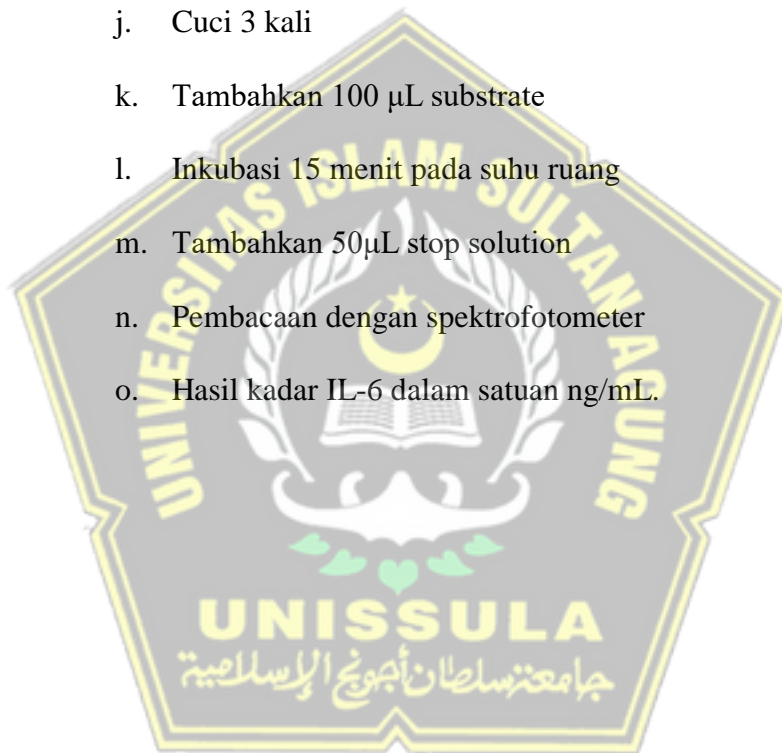
Pengambilan darah dengan cara memegang tikus dan menjepit pada tengkuk dengan jari tangan, kemudian mikrohematokrit digoreskan pada medial canthus mata di bawah bola mata ke arah foramen opticus. Kemudian mikrohematokrit diputar sampai melukai plexus, jika diputar 5x maka harus dikembalikan 5x. Darah ditampung pada ependorf.

4.6.8. Cara Pengukuran Kadar IL-6

Langkah dalam pemeriksaan kadar IL-6 menggunakan metode ELISA sebagai berikut:

- a. Tambahkan standar 15 μ L atau sampel untuk masing masing well
- b. Tambahkan 100 μ L assay buffer ke dalam vortex
- c. Inkubasi 2 jam suhu ruang

- d. Cuci 3 kali
- e. Tambah 100 μL antiserum
- f. Inkubasikan 30 menit pada suhu ruang
- g. Cuci 3 kali
- h. Tambahkan 100 μL enzyme complex
- i. Inkubasi 30 menit
- j. Cuci 3 kali
- k. Tambahkan 100 μL substrate
- l. Inkubasi 15 menit pada suhu ruang
- m. Tambahkan 50 μL stop solution
- n. Pembacaan dengan spektrofotometer
- o. Hasil kadar IL-6 dalam satuan ng/mL.



4.6.9. Prosedur pemeriksaan kadar TNF- α

Prosedur pemeriksaan kadar TNF- α serum dengan TNF rat kit yang dilakukan dengan cara berikut:

- a. Larutan sampel atau standard 50 μ l dimasukkan ke dalam well dan ditambahkan 50 μ l larutan *Biotinylated Detection A b* .
- b. Inkubasi selama 45 menit pada suhu 37⁰C
- c. Aspirasi masing-masing well dan ditambahkan 30 μ l wash buffer dan dicuci sebanyak 3 kali
- d. Menambahkan 100 μ l HRP *conjugate working solution* ke dalam well, lalu inkubasi 30 menit
- e. Menambahkan 90 μ l substrat reagent setelah di aspirasi dan kemudian diinkubasi selama 15 menit.
- f. Menambahkan stop solution sebanyak 50 μ l pada well dan dilakukan pembacaan dengan microplate menggunakan ELISA Reader pada panjang gelombang 450 nm selama 30 menit.⁵⁵

4.6.10. Cara Pengukuran Kadar Koleterol Total

Sampel darah tikus yang didapatkan ditampung dalam tabung sentrifuge selamaa 15-20 menit dengan kecepatan 7000 rpm, sehingga terbentuk 2 lapisan darah. Lapisan bawah atau debris adalah sel darah dan lapisan pertama adalah supernatan atau serum. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung eppendrof dengan mikro

pipet. Pengukuran kadar kolestrol total dengan spektrofotometer yang dinyatakan dengan satuan mg/dL.

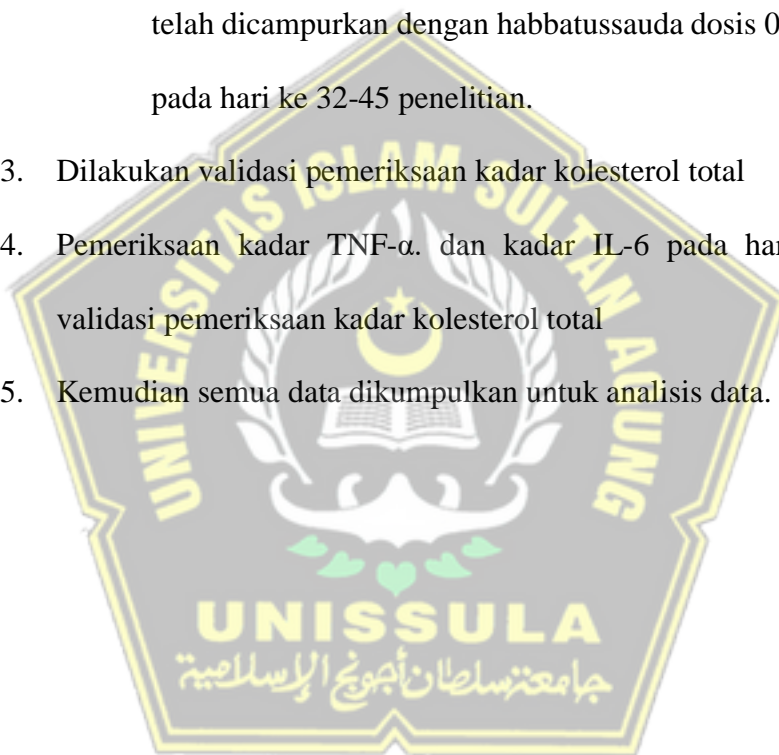
4.7. Alur Kerja

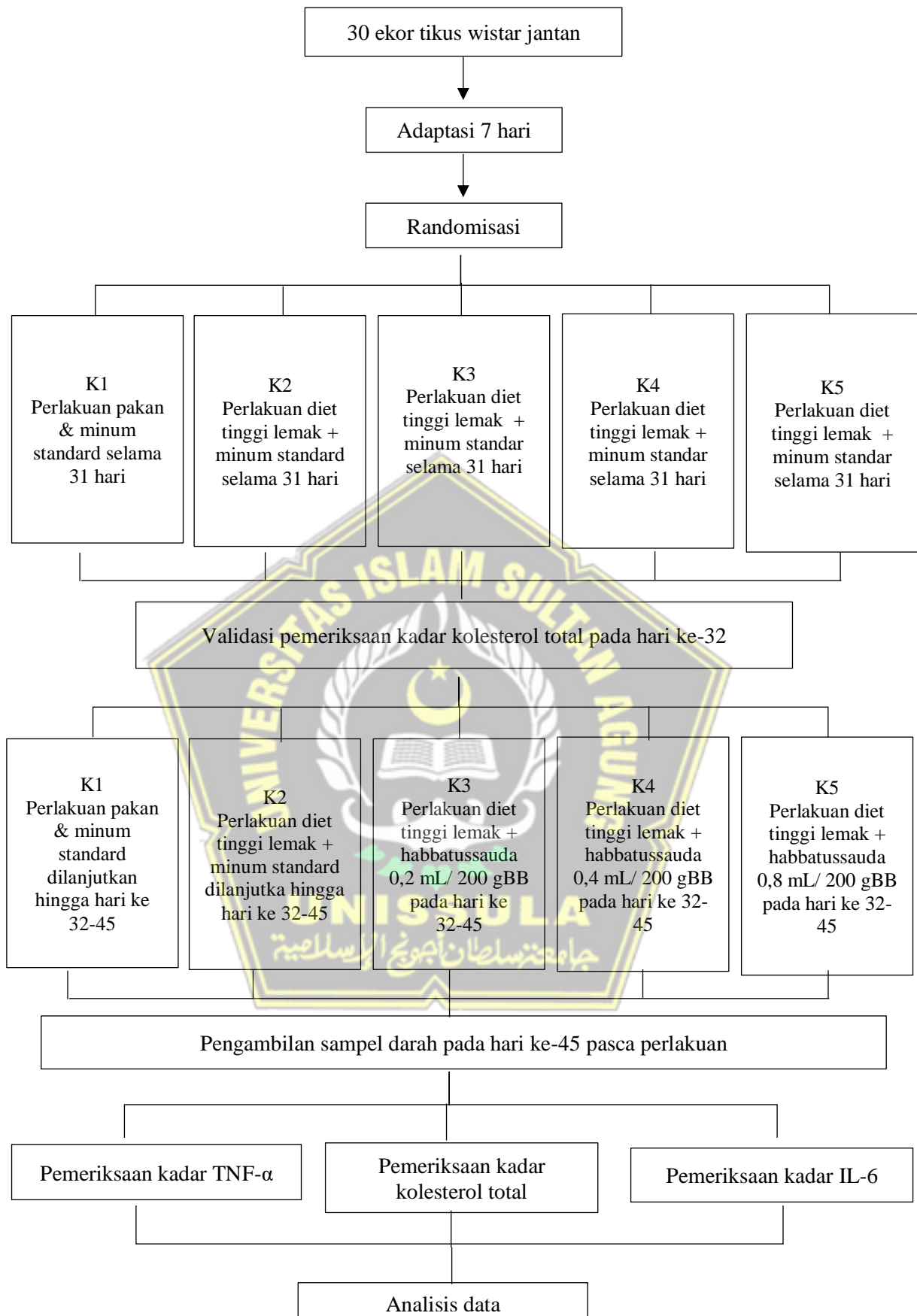
1. Tikus jantan galur wistar umur 6-8 minggu, berat badan 150 – 200 gram sebanyak 30 ekor diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari. Tikus dipelihara di kandang berukuran 40 x 30 x 20 cm pada ruangan dengan ventilasi baik, cukup cahaya, tidak bising, temperatur antara 28-32°C dengan kelembaban berkisar 50%. Setelah adaptasi, tikus dibagi menjadi 5 kelompok secara acak dan dilakukan penimbangan berat badan tikus terlebih dahulu sebelum diberi berbagai perlakuan.
2. Pemberian perlakuan
 - K1 = Perlakuan terhadap kelompok kontrol normal yaitu berupa pemberian pakan dan minum standard dari awal hingga akhir penelitian (selama 45 hari).
 - K2 = Perlakuan terhadap kelompok kontrol negatif yaitu berupa pemberian diet tinggi lemak selama penelitian berlangsung dilanjutkan dengan pemberian oral saline per hari menggunakan *stomach tube* selama 45 hari.
 - K3 = Perlakuan terhadap kelompok perlakuan bubuk habbatussauda dosis I yaitu berupa pemberian diet tinggi lemak selama 28 hari dan telah dicampurkan dengan bubuk habbatussauda dosis 0,001 mL/ gBB pada hari ke 32-45 penelitian.

K4 = Perlakuan terhadap kelompok perlakuan habbatussauda dosis II yaitu berupa pemberian diet tinggi lemak selama 44 hari yang telah dicampurkan dengan bubuk habbatussauda dosis 0,002 mL/ gBB pada hari ke 32-45 penelitian.

K5 = Perlakuan terhadap kelompok perlakuan habbatussauda dosis III yaitu berupa pemberian diet tinggi lemak selama 42 hari yang telah dicampurkan dengan habbatussauda dosis 0,004 mL/ gBB pada hari ke 32-45 penelitian.

3. Dilakukan validasi pemeriksaan kadar kolesterol total
4. Pemeriksaan kadar TNF- α . dan kadar IL-6 pada hari ke-45 serta validasi pemeriksaan kadar kolesterol total
5. Kemudian semua data dikumpulkan untuk analisis data.





Gambar 4. 2 Alur Kerja Penelitian

4.8. Analisis data

Data dikumpulkan dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk median dan standar deviasi, kemudian dilakukan uji normalitas data dengan Uji *Shapiro–Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Data yang tersebar secara normal dan memiliki varian homogen dianalisis dengan uji *one way anova* dan jika diperoleh bermakna dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD*, bila didapatkan $p < 0.05$ maka terdapat perbedaan antar kelompok. Analisis data dilakukan dengan bantuan software SPSS versi 22,0.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada 30 ekor tikus Wistar yang dibagi 5 kelompok terdiri atas K1 yaitu kelompok tikus normal dengan perlakuan pakan dan minum standard, K2 kelompok tikus yang diinduksi diet tinggi lemak, serta K3, K4 dan K5 yaitu kelompok tikus yang selain diinduksi diet tinggi lemak juga diberi habbatussauda masing-masing dalam dosis 0,001; 0,002; dan 0,004 mL/ gBB/ hari. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian habbatussauda pada kadar TNF- α dan IL-6. Hasil analisis rerata kadar TNF- α dan IL-6 setelah perlakuan tertera pada tabel 5.1.

Tabel 5. 1. Hasil analisis rerata kadar TNF- α dan IL-6

Variabel	Kelompok					<i>p</i>
	K1	K2	K3	K4	K5	
	N=6 Mean	N=6 Mean	N=6 Mean	N=6 Mean	N=6 Mean	
Kadar TNF-α (pg/ml)	83,36	246,47	155,83	171,80	195,77	
Std deviasi	23,73	43,21	36,38	22,50	47,67	
<i>Shaphiro wilk</i>	0,209*	0,664*	0,629*	0,615*	0,239*	
<i>Levene test</i>						0,409**
<i>One way anova</i>						0,000***
Kadar IL-6 (pg/ml)	33,83	115,11	58,85	76,70	78,05	
Std deviasi	8,55	16,51	19,71	6,03	17,33	
<i>Shaphiro wilk</i>	0,378*	0,557*	0,257*	0,884*	0,353*	>0,05*
<i>Levene test</i>						0,228**
<i>One way anova</i>						0,000***

Keterangan: *normal $p > 0,05$; ** homogen $p > 0,05$; ***signifikan $p < 0,05$

5.1.1. Kadar TNF- α

Tabel 5. 2. Analisis deskriptif, normalitas, homogenitas dan perbandingan kadar TNF- α antar kelompok

	Kelompok					<i>p</i>
	K1	K2	K3	K4	K5	
Mean \pm SD	83,36 \pm 23,73	246,47 \pm 43,21	155,83 \pm 36,38	171,80 \pm 22,50	195,77 \pm 47,67	
<i>Shaphiro wilk*</i>	0,209	0,664	0,629	0,615	0,239	
<i>Levene</i>						0,409
<i>One way anova</i>						0,000

*nilai p, SD: standar deviasi

Tabel 5.2. memperlihatkan bahwa dari analisis deskriptif kelompok K2 menunjukkan kadar TNF- α paling tinggi yaitu 246,47 \pm 43,21 pg/mL sedangkan kelompok K1 menunjukkan kadar TNF- α paling rendah yaitu 83,36 \pm 23,73 pg/mL. Diantara kelompok tikus dengan perlakuan habbatussauda, kadar TNF- α cenderung meningkat seiring dengan tinggi dosis habbatussauda yang diberikan. Berdasarkan hasil analisis normalitas sebaran data yang diuji dengan Shapiro Wilk didapatkan tiap-tiap kelompok memiliki sebaran data kadar TNF- α yang normal ditunjukkan dengan nilai $p > 0,05$. Hasil analisis homogenitas varian yang diuji Levene test juga memperlihatkan hasil yang homogen ditunjukkan dengan nilai p sebesar 0,409 atau $p > 0,05$.

Syarat uji beda parametrik >2 kelompok tidak berpasangan dengan demikian terpenuhi sehingga digunakan uji One Way Anova untuk melihat bermakna tidaknya perbedaan kadar TNF- α diantara kelima kelompok tikus. Berdasarkan hasil uji one way anova tersebut diperoleh nilai $p < 0,001$

sehingga dinyatakan setidaknya terdapat dua kelompok tikus dengan kadar TNF- α yang berbeda bermakna. Uji beda antar dua kelompok menjadi perlu dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang kadar TNF- α nya berbeda bermakna. Uji beda antar dua kelompok ini dilakukan dengan uji post hoc LSD, dan hasilnya disajikan pada Tabel 5.3. berikut:

Tabel 5. 3. Analisis perbedaan kadar TNF- α (pg/mL) antar kelompok

Perbandingan Kelompok	Selisih rerata (pg/mL)	p
K1 vs K2	-178,10*	0,000
K1 vs K3	-72,47*	0,002
K1 vs K4	-88,44*	0,000
K1 vs K5	-112,40*	0,000
K2 vs K3	105,63*	0,000
K2 vs K4	89,67*	0,000
K2 vs K5	65,70*	0,004
K3 vs K4	-15,97	0,451
K3 vs K5	-39,93	0,067
K4 vs K5	-23,97	0,262

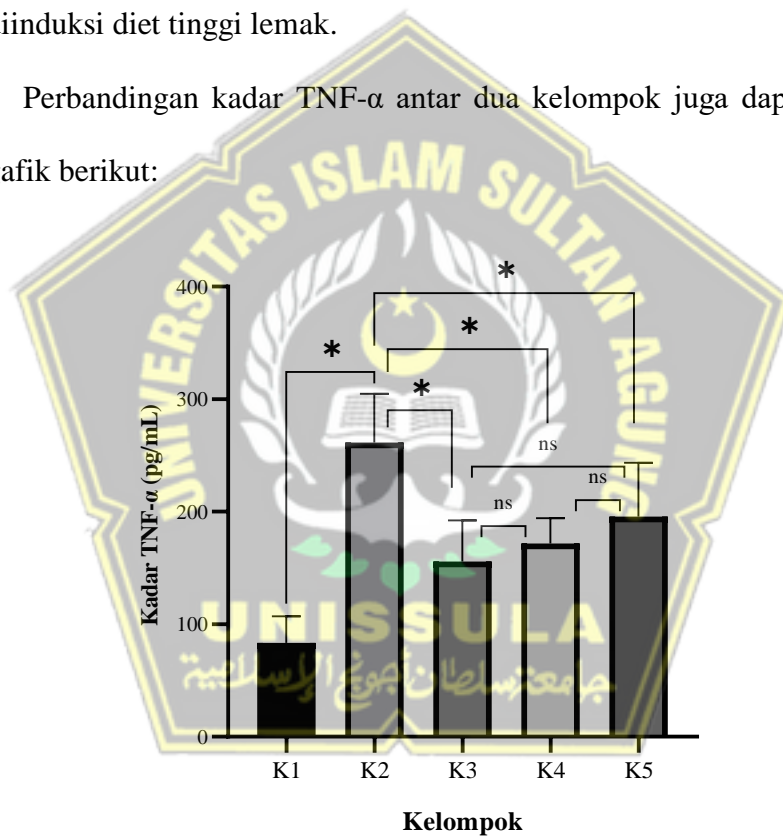
* = perbedaan bermakna

Tabel 5.3. memperlihatkan bahwa hampir semua pasangan kelompok menunjukkan perbedaan kadar TNF- α yang bermakna ($p < 0,05$); kecuali untuk pasangan kelompok K3 vs K4 dan K5, dengan kelompok K4 vs K5 ($p > 0,05$). Kadar TNF- α di kelompok K2, K3, K4 dan K5 secara bermakna lebih tinggi daripada K1. Kadar TNF- α di K2 yang lebih tinggi daripada di K1 menunjukkan bahwa induksi diet tinggi lemak berdampak pada peningkatan kadar TNF- α .

Kadar TNF- α di kelompok K3, K4 dan K5 yang secara bermakna lebih rendah daripada di K2 dapat diartikan bahwa pemberian habbatussauda

berpengaruh menurunkan kadar TNF- α pada tikus Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak. Sedangkan perbandingan kadar TNF- α antara K3, K4 dan K5 yang tidak bermakna menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis habbatussauda tidak memberikan efek yang berbeda pada kadar TNF- α . Efektifitas habbatussauda antara dosis 0,2 mL; 0,4 mL; dan 0,8 mL/200 gBB adalah relatif serupa dalam menurunkan kadar TNF- α pada tikus Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

Perbandingan kadar TNF- α antar dua kelompok juga dapat dilihat dari grafik berikut:



Gambar 5. 1. Deskripsi dan perbandingan kadar TNF- α antar kelompok

5.1.2. Kadar IL-6

Tabel 5. 4. Analisis deskriptif, normalitas, homogenitas dan perbandingan kadar IL-6 antar kelompok

	Kelompok					<i>p</i>
	K1	K2	K3	K4	K5	
Mean±SD	33,83±8,55	115,11±16,51	58,85±19,71	76,70±6,03	78,05±17,33	
<i>Shapiro wilk*</i>	0,378	0,557	0,257	0,884	0,353	
<i>Levene</i>						0,228
<i>One way anova</i>						<0,001

*nilai *p*, SD: standar deviasi

Tabel 5.4. memperlihatkan bahwa dari analisis deskriptif diperoleh kadar IL-6 tertinggi juga ada di kelompok K2 yaitu 115,11±16,51 pg/mL dan terendah di kelompok K1 yaitu 33,83±8,55 pg/mL. Diantara kelompok tikus dengan perlakuan habbatussauda, kadar IL-6 juga cenderung meningkat seiring dengan tinggi dosis habbatussauda yang diberikan. Berdasarkan hasil analisis normalitas sebaran data yang diuji dengan Shapiro Wilk didapatkan tiap-tiap kelompok memiliki sebaran data kadar IL-6 yang normal ditunjukkan dengan nilai $p > 0,05$. Hasil analisis homogenitas varian yang diuji Levene test juga memperlihatkan hasil yang homogen ditunjukkan dengan nilai *p* sebesar 0,228 atau $p > 0,05$.

Bermakna tidaknya perbedaan kadar IL-6 diantara kelima kelompok tikus kemudian diuji dengan one way anova dan diperoleh nilai $p < 0,001$ sehingga dinyatakan setidaknya terdapat dua kelompok tikus dengan kadar IL-6 yang berbeda bermakna. Uji beda antar dua kelompok dengan uji post

hoc LSD kemudian dilakukan dan diperoleh hasil sebagaimana disajikan disajikan pada tabel :

Tabel 5. 5. Analisis perbedaan kadar IL-6 (pg/mL) antar kelompok

Perbandingan Kelompok	Selisih rerata (pg/mL)	p
K1 vs K2	-81,28*	<0,001
K1 vs K3	-25,03*	0,007
K1 vs K4	-42,77*	<0,001
K1 vs K5	-44,22*	<0,001
K2 vs K3	56,26*	<0,001
K2 vs K4	38,51*	<0,001
K2 vs K5	37,06*	<0,001
K3 vs K4	-17,75*	0,046
K3 vs K5	-19,20*	0,032
K4 vs K5	-1,45	0,865

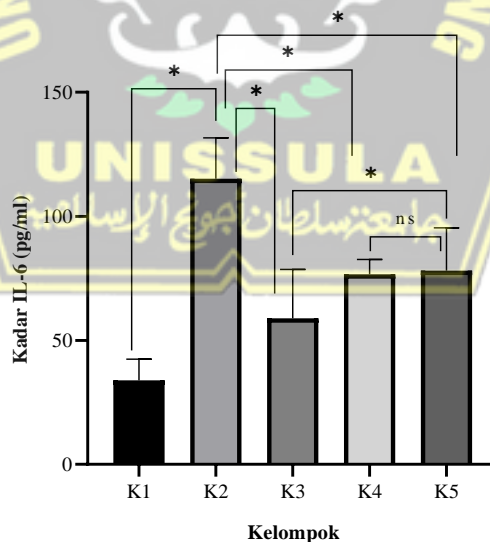
* = perbedaan bermakna

Tabel 5.5. memperlihatkan bahwa semua pasangan kelompok menunjukkan perbedaan kadar IL-6 yang bermakna ($p < 0,05$); kecuali untuk pasangan kelompok K4 vs K5 ($p > 0,05$). Kadar IL-6 di kelompok K2, K3, K4 dan K5 secara bermakna lebih tinggi daripada K1. Kadar IL-6 di K2 yang lebih tinggi daripada di K1 menunjukkan bahwa induksi diet tinggi lemak berdampak pada peningkatan kadar IL-6.

Kadar IL-6 di kelompok K3, K4 dan K5 secara bermakna lebih rendah daripada di K2 menunjukkan bahwa pemberian habbatussauda juga berpengaruh menurunkan kadar IL-6 pada tikus Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak. Namun efek penurunan yang ditunjukkan belum optimal karena kadar IL-6 di kelompok K3, K4 dan K5 masih lebih tinggi daripada di K1.

Kadar IL-6 di K4 dan K5 yang secara bermakna lebih tinggi daripada K3 menunjukkan bahwa pemberian habbatussauda dosis 0,001 mL; dan 0,002 mL/gBB memberikan efek penurunan kadar IL-6 yang lebih rendah daripada dosis 0,001 mg/gBB pada tikus Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak. Kadar IL-6 di kelompok K4 dan K5 yang tidak bermakna menunjukkan bahwa pemberian habbatussauda dosis 0,002 mL; dan 0,004 mL/gBB memberikan efek penurunan kadar IL-6 yang relatif serupa pada tikus Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak. Dari perbandingan kadar IL-6 antar kelompok K3, K4 dan K5 ini didapatkan bahwa K3 adalah yang paling baik dibandingkan K3 dan K5.

Perbandingan kadar IL-6 antar dua kelompok juga dapat dilihat dari grafik berikut:



Gambar 5.2. Deskripsi dan perbandingan kadar IL-6 antar kelompok

5.2. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan sampel tikus 30 ekor tikus galur wistar usia 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Semua tikus yang telah memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 7 hari. Setelah diadaptasi tikus diberi diet tinggi lemak selama 31 hari dan dilakukan pemeriksaan validasi kadar kolesterol total pada hari ke-32. Pada hari ke32-45 tetap diberikan diet tinggi lemak dan tikus dibagi menjadi 4 kelompok secara acak yaitu : kelompok kontrol normal adalah tikus sehat yang diberi diet pakan standar (K1), kelompok kontrol negatif adalah tikus yang diberi diet tinggi lemak tanpa habatussauda (K2), kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan dosis habbatussauda 0,001 mL/ gBB (K3), kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan dosis habbatussauda 0,002 mL/ gBB (K4), kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan dosis habbatussauda 0,004 mL/gBB (K5).

5.2.1. Hubungan Diet Tinggi Lemak dengan Kadar TNF- α dan IL-6

Diet tinggi lemak dapat menyebabkan kondisi hiperkolesterolemia di mana akan terjadi regulasi homeostasis kolesterol seluler mulai dari penyerapan, metabolisme intraseluler dan penghabisan kolesterol.^{42,56} Ketidakseimbangan yang terjadi menyebabkan konversi makrofag, sel mesangial dan sel otot polos vaskular menjadi sel busa.⁵⁶ Transporter utama yang bertanggung jawab terhadap penghabisan kolesterol adalah SR-B1, ABCG1 dan ABCA1. Gen ABCG1 dan ABCA1 diatur oleh *liver X receptor* (LXR). Selanjutnya akan mengaktifasi PPAR γ dan mendorong

pembuangan kolesterol melalui LXR dan mengurangi peradangan dengan menghambat NF-kB.³⁶ Diet tinggi lemak juga menyebabkan peningkatan kadar asam lemak bebas dari adiposit ke dalam darah yang akan mengaktivasi PKC yang akan mempengaruhi ekspresi IKK, JNK dan p38 MAPK, sehingga merangsang pelepasan faktor inflamasi seperti TNF- α dan IL-6.⁴²

Diet tinggi lemak juga dapat mengubah komposisi mikrobiota usus dengan mengurangi keanekaragaman mikroba dan mengurangi mikroba pengurai serat sehingga meningkatkan resiko obesitas. Peningkatan jumlah bakteri Enterobacteriaceae menyebabkan lipid A LPS bereaksi kuat terhadap TLR-4 pada jaringan usus menyebabkan respon inflamasi melalui aktivasi jalur persinyalan TLR-4/MyD88/NF-kB. Aktivasi jalur tersebut menyebabkan respon peradangan berupa peningkatan permeabilitas vaskular pada usus dan peningkatan kadar TNF- α dan IL-6 serum.⁴² Serat kasar yang terkandung pada habbatussauda dapat meningkatkan keanekaragaman mikrobiota usus dan produksi SCFA di usus besar, sehingga dapat meningkatkan laju metabolisme dan termogenesis.⁴²

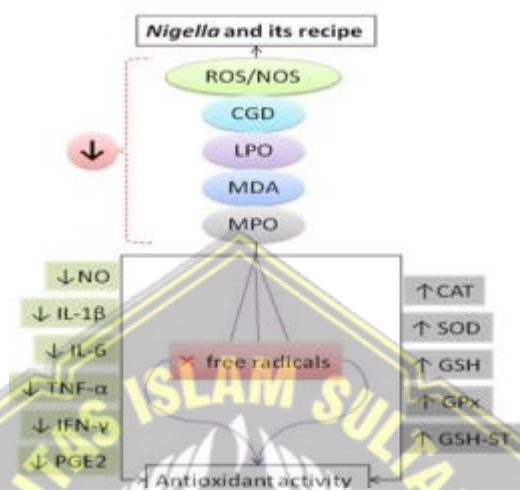
5.2.2. Pengaruh Habbatussauda Terhadap Kadar TNF- α dan IL-6

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian habbatussauda (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,001 mL/gBB, 0,002 mL/gBB dan 0,004 mL/gBB dapat menurunkan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diberi diet tinggi lemak. Penelitian oleh Alkinrinde *et.al* mengenai efek *Nigella sativa* oil diberi peroral dosis 1 ml/kg selama 7 hari berturut-turut pada tikus yang diberi CdCl₂ dapat menurunkan kadar TNF- α dan IL-2.⁵⁷ Penelitian lainnya oleh Khazaei *et. al* dengan melakukan penelitian mengenai efek *Nigella sativa* pada fibrosis miokard yang diinduksi peradangan pada tikus jantan mampu menurunkan kadar TNF- α , IL-6, MDA dan meningkatkan kadar SOD dan katalase dengan dosis *Nigella sativa* 400 mg/kg/hari secara intraperitoneal.⁵⁸

Nigella sativa memiliki efek antihiperlipidemik karena mengandung *thymoquinone* dan komponen aktif lainnya.⁵⁹ *Nigella sativa* oil peroral dengan dosis 2 mL/kg mengandung 5% *thymoquinone*. *Thymoquinone* dapat menurunkan kadar LDL, kolesterol total, TG dan menurunkan kadar HDL. *Thymoquinone* dapat memberikan efek dalam mempromosikan aktivitas arylesterase hepar, pengaturan pada gen yang mempengaruhi metabolisme kolesterol (gen Apo-A1, Apo-B100, dan reseptor LDL), dan memiliki sifat antioksidan melalui modulasi ROS.⁶⁰ *Thymoquinone* dalam *Nigella sativa* juga dapat menurunkan kadar lipid melalui regulasi gen HMG-CoA reduktase dan menghambat peroksidasi lipid non-enzimatik dalam liposom, dan bekerja sebagai pengangkut berbagai spesies oksigen

reaktif termasuk anion superoksida dan radikal hidroksil.⁵⁹ *Nigella sativa* juga mengandung serat yang akan mempengaruhi penurunan penyerapan kolesterol dan peningkatan sintesis dan degradasi asam empedu.⁵⁹ Senyawa aktif lainnya yang terkandung dalam *Nigella sativa* yaitu saponin dapat menurunkan kadar kolesterol dengan menghambat penyerapan kolesterol tersebut dan atau berikatan dengan asam empedu sehingga meningkatkan ekskresi kolesterol melalui feses. Kadar niasin (asam nikotinat) sebesar 5,7% mampu menurunkan kadar VLDL yang mengandung trigliserida dan kolesterol di hepar sehingga menurunkan kadar IDL dan LDL.⁴⁰ *Nigella sativa* mengandung polisakarida yang merupakan kelompok karbohidrat yang terbentuk dari unit monosakarida yang bergabung bersama melalui hubungan glikosidik (konfigurasi α dan β) dan memiliki aktivitas biologis seperti anti-inflamasi dan antioksidan.⁶¹ Polisakarida dapat mengatur komposisi mikrobiota usus dengan meningkatkan proporsi *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Bacteroidetes*, *Lactobacillus*, *Turicbacter* dan menurunkan jumlah *Firmicutes*. *Lactobacillus* akan menurunkan kadar kolesterol total dan LDL-C. Polisakarida *Nigella sativa* dapat mempengaruhi kandungan SCFA SCFA beredar disirkulasi melintasi sawar darah otak untuk mengurangi nafsu makan melalui mekanisme homeostasis sentral dan berkontribusi pada penghambatan sintesis asam lemak dan kolesterol di hati tikus.⁶² Flavonoid pada *Nigella sativa* dapat menurunkan sintesis kolesterol, menekan ROS dan menjaga sistem pertahanan antioksidan. Flavonoid juga meningkatkan efisiensi sel hati untuk

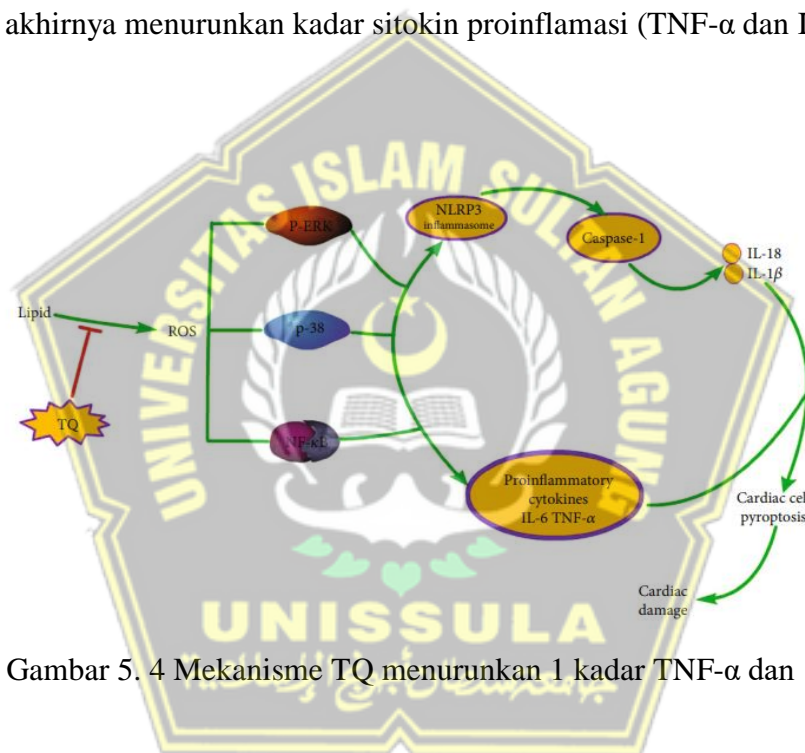
menghilangkan LDL dari sirkulasi darah dengan meningkatkan kepadatan reseptor LDL di hati dan mengikat apolipoprotein B.⁵⁹



Gambar 5. 3 Gambar mekanisme Nigella sativa sebagai antioksidan

Habbatussauda (*Nigella sativa*) mengandung *Thymoquinone* yang memiliki efek perlindungan terhadap deposisi lipid progresif yang diinduksi oleh hiperkolesterolemia, sebagai anti-inflamasi, antioksidan dan piroptosis.^{42,43} Sifat antioksidan *thymoquinone* ditunjukkan dengan penurunan kadar MDA, oxLDL serta fibronektin.⁴⁴ *Thymoquinone* dapat menurunkan kadar trigliserida dengan cara menurunkan aktivitas HMG-CoA reduktase hepatic, meningkatkan aktivitas arilesterase, mengatur gen-gen yang mempengaruhi metabolisme kolesterol dan menurunkan stress oksidatif.⁴⁵ *Thymoquinone* juga dapat memiliki efek agonis terhadap PPAR- γ dan meningkatkan regulasi Reseptor LDL di hepatosit sehingga terjadi pembuangan kolesterol, dan penekanan gen HMG-CoA R dan kolesterol sintase.¹⁰

Hiperkolesterolemia dapat meningkatkan ROS yang berlebihan dengan mengirimkan sinyal ke jalur sinyal sensitif ROS hilir, seperti NF- κ B, ERK1/2, p38 MAPK, dan pensinyalan terkait autofagi untuk menginduksi, sehingga terjadi peningkatan kadar sitokin proinflamasi (TNF- α dan IL-6). TQ yang terdapat dalam habbatussauda dapat menghambat ROS sehingga menghambat aktivasi persinyalan dan pada akhirnya menurunkan kadar sitokin proinflamasi (TNF- α dan IL-6).⁵⁹



Gambar 5. 4 Mekanisme TQ menurunkan 1 kadar TNF- α dan IL-6⁵⁸

5.3. Keterbatasan Penelitian

5.3.1. Penelitian ini tidak terdapat kelompok kontrol positif

5.3.2. Penelitian ini tidak melakukan uji komposisi habbatussauda (*Nigella sativa*) terlebih dahulu



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh pemberian habbatussauda terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dapat disimpulkan bahwa :

- 6.1.1. Pemberian habbatussauda dengan dosis 0,001 mL/gBB , 0,002 mL/gBB dan 0,004 mL/gBB selama 14 hari dapat menurunkan kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak
- 6.1.2. Rerata kadar TNF- α dan IL-6 pada kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5) lebih rendah daripada kelompok kontrol negatif (K2) namun lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol sehat (K1).
- 6.1.3. Terdapat perbedaan kadar TNF- α yang bermakna antar kelompok kontrol negatif (K2) dengan kelompok perlakuan (K3,K4, dan K5) dengan pemberian diet tinggi lemak dan dosis habbatussauda 0,001 mL/ gBB, 0,002 mL/ gBB dan 0,004 mL/gBB. Namun perbandingan kadar TNF- α antara K3, K4 dan K5 yang tidak bermakna menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis habbatussauda tidak memberikan efek yang berbeda pada kadar TNF- α yang diinduksi diet tinggi lemak

6.1.4. Terdapat perbedaan kadar IL-6 yang bermakna antar kelompok kontrol negatif (K2) dengan kelompok perlakuan (K3, K4, dan K5) dengan pemberian diet tinggi lemak dan dosis habbatussauda 0,001 mL/gBB, 0,002 mL/ gBB dan 0,004 mL/gBB. Perbandingan kadar IL-6 antar kelompok K3, K4 dan K5 didapatkan bahwa K3 adalah yang paling baik dibandingkan K4 dan K5.

6.2. Saran

- 6.2.1. Perlu ditambahkan kelompok kontrol positif dengan fungsi yang hampir serupa dengan habbatussauda (*Nigella sativa*), seperti obat golongan fibrat, sehingga dapat dilihat perbedaan efek dari keduanya
- 6.2.2. Perlu dilakukan uji komposisi dari habbatussauda terlebih dahulu sebelum digunakan dalam penelitian selanjutnya

DAFTAR PUSTAKA

1. Huff T, Boyd B JI. No Title [Internet]. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470561/>
2. Erwinanto, Santoso A, Putranto JNE, Tedjasukmana P, Sukmawan R, Suryawan R, et al. Panduan Tata Laksana Dislipidemia 2017. Indonesia: PERKI; 2017. 32 p.
3. Namazi N, Larijani B, Ayati MH, Abdollahi M. The effects of *Nigella sativa* L. on obesity: A systematic review and meta-analysis. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;219:173–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.001>
4. Susilowati R, Ainuzzakki V, Nadif MR, Diana AR. The efficacy of *Nigella Sativa* L extracts to reduce cardiovascular disease risk in diabetic dyslipidemia. *AIP Conf Proc*. 2019;2120(July).
5. Pei ZW, Guo Y, Zhu HL, Dong M, Zhang Q, Wang F. Thymoquinone Protects against Hyperlipidemia-Induced Cardiac Damage in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient (LDL-R^{-/-}) Mice via Its Anti-inflammatory and Antipyroptotic Effects. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
6. Lestari VY. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histo1. Lestari VY. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histopatologi Jejunum p. *Univ Brawijaya* [Internet]. 2018; Available from: <http://repository.ub.ac.id/id/eprint/167989>
7. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Laporan_Nasional_RKD2018_FINAL.pdf [Internet]. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2018. p. 674. Available from: http://labdata.litbang.kemkes.go.id/images/download/laporan/RKD/2018/Laporan_Nasional_RKD2018_FINAL.pdf
8. Dai, Haijiang, Tariq A. AlsalheI, Nasr ChalghafI, Matteo RiccòI, Nicola Luigi Bragazzi JW. dai.pdf. *Res Artic Glob Burd Dis* Attrib to high body mass index 195 Ctries Territ 1990–2017 An Anal Glob Burd Dis Study [Internet]. 2020; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7386577/>
9. Kumar R, Akhtar F, Rizvi SI. Hesperidin attenuates altered redox homeostasis in an experimental hyperlipidaemic model of rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2020;47(4):571–82.
10. Hadi V, Pahlavani N, Malekahmadi M, Nattagh-Eshtivani E, Navashenaq JG, Hadi S, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M, Askari G NA. *Nigella sativa* in controlling Type 2 diabetes, cardiovascular, and rheumatoid arthritis diseases: Molecular aspects. *J Res Med Sci* [Internet]. 2021;26:20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8240544/#ref43>

11. Esmail M, Anwar S, Kandeil M, El-Zanaty AM, Abdel-Gabbar M. Effect of *Nigella sativa*, atorvastatin, or L-Carnitine on high fat diet-induced obesity in adult male Albino rats. *Biomed Pharmacother.* 2021;141.
12. Saheb SH, SD D, Das KK, S H. Antioxidant Effect of *Nigella Sativa* Seed Powder and Thymoquinone in Normal and Sterptozotocine Induced Diabetic Albino Rats. *Int J Integr Med Sci.* 2016;3(3):242–7.
13. Samsu N. *Patogenesis Penyakit Ginjal Diabetik.* Malang: UB Press; 2018. 79 p.
14. Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Tumor Necrosis Factor. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics.* Second. Elsevier; 2013. p. 229–31.
15. Rauf M, Kusuma MI. *Bedah Emergensi Bidang Digestif.* Rauf M, Kusuma MI, Arsyad A, Mudatsir, Mappiwali A, T N, editors. Yogyakarta: Bintang Pustaka Madani; 2021. 51 p.
16. FK Hewan Unsyiah. *Buku Ajar Patologi.* Banda Aceh: Syiah Kuala University Press; 2018. 86 p.
17. Nasution AI. *Biomolekuler (untuk Ilmu Kedokteran Dasar).* Banda Aceh: Syah Kuala University Press; 2016. 86 p.
18. Agustin I, Mayashinta DK, Sudjari, Indra MR. *Mengenal Toxoplasma gondii, Obesitas dan Sindrom Metabolik.* Malang: UB Press; 2018. 84 p.
19. Unsunidhal L, Mahmud A, Mariyana R, Ramdhini RN, Jannah R, Tania POA, et al. *Genetika dan Biologi Reproduksi.* Medan: Yayasan Kita Menulis; 2021. 62 p.
20. Sellati TJ, Sahay B. Cells of Innate Immunity: Mechanisms of Activation. In: *Pathobiology of Human Disease, A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms.* Elsevier; 2014. p. 258–74.
21. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012;119(3):651–65.
22. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):49–62.
23. Mifflin L, Ofengeim D, Yuan J. Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(8):553–71.
24. Valaperti A, Li Z, Vonow-Eisenring M, Probst-Muller E. Diagnostic methods for the measurement of human TNF-alpha in clinical laboratory. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;179(113010).
25. Çetin I, Çetin A, Şen A, Cimen L, Çimen B, Savas G, et al. Comparison of ELISA and flow cytometry for measurement of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *Turkish J Biochem.*

2018;43(5):540–8.

26. Knight V, Long T, Meng QH, Linden MA, Rhoads DD. Variability in the laboratory measurement of cytokines: A longitudinal summary of a college of American pathologists proficiency testing survey. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;144(10):1230–3.
27. Kartini DS. Analisis Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Cairan Bilasan Bronkus Pada Pasien Kanker Paru. Vol. 1, PPDS-1 (SP.1) Ilmu Patologi Klinik FK Unhas. Universitas Hasanuddin; 2018.
28. Ridker PM, Rane M. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2021;128(11):1728–46.
29. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncol.* 2020;98(3):131–7.
30. Kreiner FF, Kraaijenhof JM, Herrath M Von, Kees G, Hovingh K, Scholten BJ Von, et al. Expert Review of Clinical Immunology Interleukin 6 in diabetes , chronic kidney disease , and cardiovascular disease : mechanisms and therapeutic perspectives ABSTRACT. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2022;18(4):377–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/1744666X.2022.2045952>
31. Luo P, Wang Y, Zhao C, Guo J, Shi W, Ma H, et al. Bazedoxifene exhibits anti-inflammation and anti-atherosclerotic effects via inhibition of IL-6/IL-6R/STAT3 signaling. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2021;893(December 2020):173822. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173822>
32. Journal W, Pharmacy OF. *Biomedical European of.* 2021;(April).
33. Cerqueira NMFS, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry.* 2016;55(39):5483–506.
34. Peter J. Kennelly, Kathleen M. Botham, Owen McGuinness, Victor W. Rodwell PAW. Harper's Illustrated Biochemistry. In: Harper's Illustrated Biochemistry. 32nd ed. Mc Graw Hill; 2022. p. 247–68.
35. Edmond. *Metabolisme lipoprotein.* 2013;
36. Fangbo Zhang, Yu Li, Weijuan Xin, Lifang Wang, Yi Zhang, He Xu, Hongjie Wang, Haiyu Zhao, Hongjun Yang, Nan Si BB. Gypenosides and capsaicinoids in combination ameliorates high-fat-diet- induced rat hyperlipidemia via the PPAR γ -LXR α -ABCA1/ABCG1 pathway, *Journal of Functional Foods.* *J Funct Foods* [Internet]. 108. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464623003146>
37. Junaedi E, Yulianti S, Suty S, Kuncari ES. *Kedahsyatan Habbatussauda Mengobati Berbagai Penyakit* [Internet]. 1st ed. e-Jurnal Pustaka Kesehatan.

Jakarta: AgroMedia Pustaka; 2011. Available from: https://books.google.co.id/books?hl=id&lr=&id=ydKKypYmafGC&oi=fnd&pg=PA1&dq=info:q_iU01n-0RkJ:scholar.google.com/&ots=5tXOY8Tto_&sig=L9ZNxENUJaKOczU2-xwNCoO5NWU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

38. Safarsyah AI. Hadis Nabi SAW Tentang Obat Dalam Tinjauan Ilmu Kedokteran Modern. *Al-Dzikra J Stud Ilmu al-Qur'an dan al-Hadits*. 2019;12(2):165–88.
39. Oktaria, R., Dewi, R., Sari P. Efek Protektif Thymoquinone Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Spraque dawley yang Diinduksi Rifampisin. *Univ Lampung [Internet]*. 2019;78–82. Available from: <http://digilib.unila.ac.id/25411/>
40. Rahmi F. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Kadar Serum Glutamate Piruvat Transaminase (SGPT), Serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase (SGOT) dan Gambaran Histopatologi Hepar pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Hiperkolester. 2019.
41. Ahmad MF, Ahmad FA, Ashraf SA, Saad HH, Wahab S, Khan MI, et al. An updated knowledge of Black seed (*Nigella sativa* Linn.): Review of phytochemical constituents and pharmacological properties [Internet]. Vol. 25, *Journal of Herbal Medicine*. Elsevier GmbH.; 2021. 100404 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100404>
42. Chang WC, Wu JSB, Chen CW, Kuo PL, Chien HM, Wang YT, et al. Protective effect of vanillic acid against hyperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia via alleviating hepatic insulin resistance and inflammation in High-Fat Diet (HFD)-fed rats. *Nutrients*. 2015;7(12):9946–59.
43. Safi S, Razmpoosh E, Fallahzadeh H, Mazaheri M, Abdollahi N, Nazari M, et al. The effect of *Nigella sativa* on appetite, anthropometric and body composition indices among overweight and obese women: A crossover, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Complement Ther Med*. 2021;57(102653):1–10.
44. Shafik NM, Mariah RA, Baghdadi H, Shafik SR. Impact of *Nigella Sativa* , Omega-3 Fatty Acids and Chromium Picolinate on NF- κ B / leptin -insulin Axis in Obese Subjects with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Med Biol Res*. 2015;3(6):139–45.
45. Shahbodi M, Emami SA, Tayarani-najaran Z. Effects of Thymoquinone on Adipocyte Differentiation in Human Adipose-Derived Stem. *Mol Biol Rep*. 2021;1–18.
46. Ali SA, Asghar F, Nafees M, Tayyab M. Effect of *Nigella Sativa* (Kalonji) on Serum Lipid Profile. *Annals*. 2012;18(2):224–8.

47. Licari M, Raffaele M, Rosman ZF, Schragenheim J, Bellner L, Vanella L. Beneficial Effects of Thymoquinone on Metabolic Function and Fatty Liver in a Murine Model of Obesity. *J Food Nutr Sci.* 2019;9(2):751.
48. Razmpoosh E, Safi S, Mazaheri M, Salehi-Abargouei A, Abdollahi N, Nazari M, et al. Effects of oral *Nigella sativa* oil on the expression levels and serum concentrations of adiponectin, PPAR- γ , and TNF- α in overweight and obese women: A study protocol for a crossover-designed, double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *Trials.* 2019;20(1):1–8.
49. Syamsuni HR, Rantisari AM. *Statistik dan Metodologi Penelitian.* Yogyakarta: Penerbit KBM Indonesia; 2021. 173 p.
50. Alkadri SLF, Ilmiawan MI, Handini M. Efek Protektif Kombinasi Minyak Jintan Hitam dan Madu terhadap Hepatotoksisitas pada Tikus Akibat Sisplatin. *eJournal Kedokt Indones.* 2019;7(2).
51. Al-Gayyar MMH, Hassan HM, Alyoussef A, Abbas A, Darweish MM, El-Hawwary AA. *Nigella sativa* oil attenuates chronic nephrotoxicity induced by oral sodium nitrite: Effects on tissue fibrosis and apoptosis. *Redox Rep.* 2016;21(2):50–60.
52. Pop RM, Sabin O, Suciú Şoimiţa, Vesa SC, Socaci SA, Chedea VS, et al. *Nigella Sativa*'s anti-inflammatory and antioxidative effects in experimental inflammation. *Antioxidants.* 2020;9(10):1–13.
53. Fabiana Meijon Fadul. Pengaruh Pemberian Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Motilitas Spermatozoa Tikus Wistar Hiperlipidemia. 2019;
54. Solmaz Mohammed N, Hilal Ö, Nurşen B. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish J Pharm Sci.* 2017;14(2):201–6.
55. Efek Sari Biji Kedelai (*Glycinemax*), Rimpang Jahe (*Zingerofficinale*) dan Kombinasina terhadap Kadar Serum Tumor Necrosis Factor TNF- α) Diameter Lumen Aorta Tikus Model Diabetes. :498–505.
56. Pei Z, Zhu L, Liu Y, Li N, Yang G, Liu H. Thymoquinone reduces kidney damage in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-cholesterol diet. *RSC Adv* [Internet]. 2017;7(83):53002–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA07040C>
57. Akinrinde AS, Adekanmbi AO, Olojo FO. *Nigella sativa* oil protects against cadmium-induced intestinal toxicity via promotion of anti-inflammatory mechanisms, mucin expression and microbiota integrity. *Avicenna J Phytomedicine.* 2022;12(3):241–56.
58. Khazaei M, Norouzi F, Abareschi A, Asgharzadeh F, Beheshti F, Hosseini M, et al. The effect of *Nigella sativa* on inflammation-induced myocardial fibrosis in male rats. *Res Pharm Sci.* 2017;12(1):74–81.

59. Abbas AH. Antihyperglycemic , Antihyperlipidemic Effects of Ethanol Extract of Nigella Sativa Seeds in Streptozocin / High Fat Diet Induced Hyperglycemic. *World J Pharm Pharm Sci*. 2018;7(3):110–22.
60. Abdelrazek HMA, Kilany OE, Muhammad MAA, Tag HM, Abdelazim AM. Black seed thymoquinone improved insulin secretion, hepatic glycogen storage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
61. Trigui I, Yaich H, Sila A, Cheikh-Rouhou S, Bougatef A, Blecker C, et al. Physicochemical properties of water-soluble polysaccharides from black cumin seeds. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;117:937–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.202>
62. Dong J, Liang Q, Niu Y, Jiang S, Zhou L, Wang J, et al. Effects of Nigella sativa seed polysaccharides on type 2 diabetic mice and gut microbiota. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;159:725–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.042>
63. Mohtashami R, Fallah Huseini H, Heydari M, Amini M, Sadeqhi Z, Ghaznavi H, et al. Efficacy and safety of honey based formulation of Nigella sativa seed oil in functional dyspepsia: A double blind randomized controlled clinical trial. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;175:147–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.022>
64. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of black seed (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone. *J Pharmacopuncture*. 2017;20(3):179–93.
65. Kumar S, Dobos GJ, Rampp T. The Significance of Ayurvedic Medicinal Plants. *J Evidence-Based Complement Altern Med*. 2017;22(3):494–501.
66. Atiqah N, Abdul A, Rahmat A, Jaafar HZE. Protective Effects of Tamarillo (Cyphomandra betacea) Extract against High Fat Diet Induced Obesity in Sprague-Dawley Rats. 2015;2015.