AKTIVITAS EKSTRAK SERBUK JINTAN HITAM (*Nigella sativa L)* SEBAGAI UPAYA PREVENTIF HIPERLIPIDEMIA: Uji Praklinik Secara *In Vivo* Pada Mencit Yang Diinduksi *Poloxamer*

Skripsi



Diajukan oleh :

Nurul Isnaeni

07 613 071

JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
AGUSTUS 2011

AKTIVITAS EKSTRAK SERBUK JINTAN HITAM (*Nigella sativa L)* SEBAGAI UPAYA PREVENTIF HIPERLIPIDEMIA: Uji Praklinik Secara *In Vivo* Pada Mencit Yang Diinduksi *Poloxamer*

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi

(S.Farm)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta

Oleh :

NURUL ISNAENI

07613071

JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
AGUSTUS 2011

SKRIPSI

AKTIVITAS EKSTRAK SERBUK JINTAN HITAM (*Nigella sativa L)* SEBAGAI UPAYA PREVENTIF HIPERLIPIDEMIA: Uji Praklinik Secara *In Vivo* Pada Mencit Yang Diinduksi *Poloxamer*

Yang diajukan oleh:

NURUL ISNAENI
07613071

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,	Pembimbing Pendamping,
Asih Triastuti, M. Pharm., Apt.	**Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt.**

ii

SKRIPSI

AKTIVITAS EKSTRAK SERBUK JINTAN HITAM (*Nigella sativa L*) SEBAGAI UPAYA PREVENTIF HIPERLIPIDEMIA: Uji Praklinik Secara *In Vivo* Pada Mencit Yang Diinduksi *Poloxamer*

Oleh:

NURUL ISNAENI
07 613 071

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 12 Agustus 2011

Disetujui oleh:

1. Asih Triastuti, M.Pharm., Apt. (.....)
2. Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt. (.....)
3. Dr. drh. Puji Astuti, MP (.....)
4. Dr. rer. nat. Nanang Fakhrudin, S. F, M. Si., Apt (.....)

Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Yandi Syukri, M. Si., Apt

iii

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, Agustus 2011

Penulis,

Nurul Isnaeni

Man Jadda Wajada
(siapa yang bersungguh-sungguh, akan berhasil)
Man Shabara Zhafira
(siapa yang bersabar, akan beruntung)



Karya kecil ini ku persembahkan untuk :

Kedua orang tua ku..H. Suyono dan Hj. Stiti Asifah
atas segala pengorbanan yang telah diberikan untuk ku..limpahan kasih sayang yang tak henti-hentinya mengalir, serta doa yang menghantarkanku hingga mencapai titik ini.
Adik-adikku tercinta.Kurnia Salawati, Wirdatul Ummah dan Alya Nur Azizah
..terima kasih atas segala motivasi yang telah kalian berikan..
Seluruh keluarga besar ku...
Dan khususnya untuk kedua nenek ku tercinta.
.I hope, with this little work can make them smile in heaven..
Almamaterku Universitas Islam Indonesia..khususnya Farmasi 2007..
Thanks so much for the wonderfull 4 years..I'll never forget..

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirobbil' alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas berkat Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul "**AKTIVITAS EKSTRAK SERBUK JINTAN HITAM (*Nigella Sativa L.)* SEBAGAI UPAYA PREVENTIF HIPERLIPIDEMIA : Uji Praklinik Secara *In Vivo* Pada Mencit Yang Diinduksi *Poloxamer*"**. Adapun maksud penulisan skipsi ini adalah untuk memenuhi syarat kelulusan strata-1 Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Penulisan skripsi ini dapat terlaksana atas doa, bantuan, dan motivasi serta pengarahan-pengarahan berbagai pihak. Untuk itu pada kesempatan kali ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Yandi Syukri, M.Si., Apt. selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan bantuan dan dukungannya selama ini.
2. Bapak M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt. selaku Ketua Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia.
3. Asih Triastuti, M.Pharm., Apt. selaku Dosen Pembimbing utama yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, saran serta motivasi dari awal penelitian hingga akhir penyusunan skripsi ini.
4. Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing pendamping yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, saran serta motivasi dari awal penelitian hingga akhir penyusunan skripsi ini.
5. Dr. drh. Puji Astuti, MP dan Dr. rer. nat. Nanang Fakhrudin, S. F, M. Si., Apt selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritikan dan masukan yang membangun untuk kesempurnaan skripsi ini.
6. Kedua orang tuaku tersayang H. Suyono dan Hj. Siti Asifah atas segala pengorbanan, doa dan motivasi yang telah diberikan.

7. Ketiga adikku tercinta Kurnia Salawati, Wirdatul Ummah dan Alya Nur Azizah atas semangat dan doa yang telah diberikan.
8. Teman teman penelitian ku. Liza Anisa, Eka Yuliana, Ani Agustina dan Endah Ayu. Thanks so much atas kebersamaan yang indah ini, banyak hal yang bisa dipelajari, semoga penelitian kita dapat bermanfaat. Amin
9. My new family SC'07 Yeyen, Dewi, Nisa, mb Endah, Ul dan Dini. Terimaksih atas kebersamaannya selama ini
10. Teman-teman kos Bunga, Rachmi Yunita, Annisa Triyanti dan Dinda Kusuma Wardhani, terima kasih atas semangat dan motivasinya ya.
11. Seluruh staf laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, yang telah membantu dan membimbing dengan sabar dalam menyelesaikan penelitian ini.
12. Segenap civitas akademik Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia yang secara tidak langsung telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.
13. Berbagai pihak yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semoga Allah membalas kebaikan mereka dengan segala anugerah, rahmah, dan hidayah-Nya. Akhir kata penulis mohon maaf dengan ketulusan hati seandainya dalam penulisan skripsi ini terdapat kekhilafan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun untuk perbaikan dan kesempurnaan skripsi ini. Harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya serta perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan pada khususnya. Amin.

Wassalamualaikum Wr. Wb

Yogyakarta, Agustus 2011

Penulis,

Nurul Isnaeni

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL……..... **i**
HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING……..... **ii**
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI……..... **iii**
HALAMAN PERNYATAAN……..... **iv**
HALAMAN PERSEMBAHAN……..... **v**
KATA PENGANTAR……..... **vi**
DAFTAR ISI……..... **viii**
DAFTAR GAMBAR……..... **x**
DAFTAR TABEL……..... **xi**
DAFTAR LAMPIRAN……..... **xii**
INTISARI……..... **xiii**
ABSTRACT……..... **xiv**
BAB I. PENDAHULUAN……..... **1**
A. Latar Belakang Masalah……..... 1
B. Perumusan Masalah……..... 3
C. Tujuan Penelitian……..... 3
D. Manfaat Penelitian……..... 4
BAB II. STUDI PUSTAKA…….…….. **5**
A. Tinjauan Pustaka……..... 5
1. Jintan hitam..... 5
2. Ekstraksi……..... 7
3. Ekstrak terstandar……..... 8
4. Hiperlipidemia.……..... 10
5. Uji antihiperlipidemia……..... 12
B. Landasan teori.....……..... 16
C. Hipotesis.....…….....……..... 16
BAB III. METODE PENELITIAN…….…….... **17**
A. Bahan dan Alat……...……..... 17
1. Bahan..... 17
2. Alat..... 17
B. Cara Penelitian……...……..... 18
1. Pembuatan ekstrak jintan hitam..... 18

2. Penetapan parameter standar ekstrak..... 18
3. Induksi hiperglikemia pada mencit..... 20
4. Pembuatan larutan stok..... 20
5. Perlakuan pada hewan uji..... 21
6. Metode analisis serum..... 22
C. Skema Penelitian……...…….... 24
D. Analisis data...……...…….... 25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN…….…..… 26
A. Hasil ekstraksi jintan hitam (*Nigella sativa L.)*……..... 26
B. Hasil standarisasi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.)*…..... 27
C. Optimasi dosis dan metode……..... 30
D.Uji Aktivitas Ekstrak Jintan Hitam Ditinjau dari Parameter Kolesterol danTrigliserida……..... 31
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN 36
A. Kesimpulan....……...…….... 36
B. Saran.....……...…….... 36
DAFTAR PUSTAKA 37
LAMPIRAN..... 40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Biji jintan hitam	5
Gambar 2.	Struktur kimia senyawa yang terkandung dalam jintan hitam	7
Gambar 3.	Perbandingan arteri normal (A) dengan arteri dengan penumpukan Plaq (B)	11
Gambar 4.	Struktur simvastatin.....	11
Gambar 5.	Pengambilan darah dari vena lateral.....	22
Gambar 6.	Skema penelitian	24
Gambar 7.	Ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.)* berwarna brown	28
Gambar 8.	Hasil uji kualitatif alkaloid pada ekstrak jintan hitam dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).....	29
Gambar 9.	Grafik rata-rata konsentrasi kolesterol dan trigliserida	32
Gambar 10.	Serbuk jintan hitam.....	41
Gambar 11.	Maserasi jintan hitam	41
Gambar 12.	Proses penyaringan dengan corong buchner	41
Gambar 13.	Rotary evaporator	41
Gambar 14.	Proses ethanasi.....	58
Gambar 15.	Pembedahan mencit.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Kandungan reagen kolesterol (Fluitest® Chol).....	14
Tabel II.	Kandungan reagen trigliserida (Fluitest® TG).....	15
Tabel III.	Data hasil uji standarisasi ekstrak jintan hitam.....	27
Tabel IV.	Hasil kadar kolesterol dan trigliserida (mg/dl) pengujian aktivitas jintan hitam sebagai terapi preventif hiperlipidemia.....	32
Tabel V.	Data hasil uji organoleptis ekstrak jintan hitam.....	44
Tabel VI.	Data hasil perhitungan bobot jenis ekstrak jintan hitam.....	44
Tabel VII.	Data absorbansi dan kadar kolesterol hewan uji.....	48
Tabel VII.	Data absorbansi dan kadar trigliserida hewan uji	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan kelaikan etik *(ethical clearance)*..... 40

Lampiran 2. Gambar bahan dan alat ekstraksi 41

Lampiran 3. Surat keterangan pembelian hewan uji penelitian 42

Lampiran 4. Color chart 43

Lampiran 5. Data hasil uji standarisasi ekstrak..... 44

Lampiran 6. Perhitungan dosis..... 45

Lampiran 7. Data absorbansi dan kadar kolesterol hewan uji 48

Lampiran 8. Analisis statistik kadar kolesterol hewan uji 49

Lampiran 9. Data absorbansi dan kadar trigliserida hewan uji 53

Lampiran 10. Analisis statistik kadar trigliserida hewan uji 54

Lampiran 11. Proses pembedahan mencit dan pengujian serum hewan uji 58

Lampiran 12. Surat keterangan reagen kolesterol 59

Lampiran 13. Surat keterangan reagen trigliserida 60

AKTIVITAS EKSTRAK
SERBUK JINTAN HITAM (*Nigella sativa L)*
SEBAGAI UPAYA PREVENTIF HIPERLIPIDEMIA:
Uji Praklinik Secara *In Vivo* Pada Mencit

Yang Diinduksi *Poloxamer*

INTISARI

Hiperlipidemia menjadi salah satu penyebab penyakit-penyakit serius di dunia, seperti artherosclerosis, hipertensi, diabetes, dan obesitas. Penggunaan obat-obatan antihiperlipidemia jangka panjang dapat menimbulkan berbagai efek samping. Sehingga banyak dikembangkan obat yang berasal dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang digunakan adalah jintan hitam. Secara empiris jintan hitam dipercaya memiliki aktivitas sebagai antihiperlipidemia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak serbuk jintan hitam (*Nigella sativa L.*) sebagai upaya preventif hiperlipidemia yang diujikan pada mencit jantan yang diinduksi poloxamer. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur *balb/c* yang berumur 8 minggu berjumlah 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu : kelompok normal (aquadest), kontrol (aquadest), reference (simvastatin 10 mg/70 kg), dan dua kelompok uji yang masing-masing diberi ekstrak jintan hitam dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB. Selama 14 hari masing-masing kelompok diberikan perlakuan sesuai kelompoknya secara peroral. Pada hari ke-14 mencit dipuasakan dan diinduksi poloxamer dengan dosis 400 mg/kgBB secara intraperitonial, kecuali kelompok normal tidak diinduksi *poloxamer*. Lalu pada keesokkan harinya mencit dikorbankan dan diambil darah melalui vena lateral. Kemudian dilakukan penetapan kadar kolesterol dan trigliserida menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*. Data yang didapat dianalis dengan *one way Anova* ($p < 0,05$) dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan esktrak jintan hitam 750 mg/kgBB dan jintan hitam 1500 mg/kgBB dapat menurunkan kadar kolesterol namun tidak bisa menurunkan kadar trigliserida darah mencit hiperlipidemia.

Kata kunci : Hiperlipidemia, Jintan hitam *(Nigella sativa L.), poloxamer*, preventif.

ACTIVITY OF EXTRACT OF BLACK CUMIN POWDER (*Nigella sativa L.)* AS A PREVENTIVE EFFORT OF HIPERLIPIDEMIA : Test *In Vivo* in Mice Induced By *Poloxamer*

ABSTRACT

Hyperlipidemia is one of causes of serious diseases in the world such as atherosclerosis, hypertension, diabetes, and obesity. Empirically, black cumin is believed having activity as anti-hyperlipidemia. This research was done to identify activity of black cumin powder extract as preventive effort against hyperlipidemia tested on male mice induced with poloxamer. Animal model were used 25 male mice strain *balb/c* at 1,5 months old, divided into five groups: normal group (aquadest), control (aquadest), reference (simvastatin 10mg/ 70 kg) and two test groups given orally with black cumin extract at 750 mg/kg body and 1500 mg/kg body dosage for 14 days. Then, the test animals were fast and induced with 40mg/kg body poloxamer intraperitoneal, except normal group. In the next day, cholesterol and triglyceride level were determined using UV-Vis spectrophotometer. The obtained data was analyzed using *one way* Anova ($p<0.05$) at 95% significance level. The results indicated that treatment of 750 and 1500 mg/kg body black cumin can decrease cholesterol level but cannot reduce triglyceride level of hyperlipidemia mice.

Keyword : Black Cumin (*Nigella sativa L.*), Hyperlipidemia, Preventive, *Poloxamer*

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Dewasa ini pola hidup masyarakat Indonesia di wilayah perkotaan berubah, yang cenderung mengkonsumsi makanan cepat saji (*fast food)* dengan kadar nutrisi rendah dan hampir tidak mengandung protein, sedangkan kandungan lemak, gula dan garam yang terlalu tinggi. Hal inilah yang dapat menyebabkan munculnya penyakit metabolik seperti diabetes melitus dan hiperlipidemia [(1)].

Hiperlipidemia adalah peningkatan salah satu atau lebih kolesterol ester, fosfolipid atau trigliserida[(2)] atau dapat dinyatakan sebagai kondisi ketidaknormalan dimana terjadi peningkatan konsentrasi dari beberapa atau semua lipid dan atau lipoprotein dalam darah[(3)]. Lemak darah terdiri dari kolesterol, trigliserida, fosfolipid, dan asam lemak bebas, yang mengalir melalui pembuluh darah dalam bentuk lipoprotein. Metabolisme lemak biasanya menjaga keseimbangan antara sintesis dan degradasinya. Jika keseimbangan itu hilang atau terganggu maka dapat menimbulkan terjadinya hiperlipidemia, khususnya hiperkolesterolmia dan hipertrigliseridemia[(4)]. Berdasarkan data yang dikemukakan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2004, prevalensi hiperkolesterolemia di Indonesia pada usia 25 hingga 34 tahun sebesar 9,3 persen, sementara pada usia 55 hingga 64 tahun sekitar 15,5 persen dan angka tersebut diperkirakan akan meningkat setiap tahunnya[(5)].

Ketidaknormalan metabolisme lemak merupakan penyebab berbagai macam penyakit-penyakit serius seperti atherosklerosis, hipertensi, obesitas, diabetes, penurunan fungsi beberapa organ tubuh dan beberapa penyakit lain [(6)]. Hiperkolesterolmia dan hipertrigliserida merupakan faktor resiko utama (salah satu atau keduanya) yang dapat mempercepat pembentukan atherosklerosis dan keparahannya[(7)]. Selain itu hiperlipidemia juga merupakan faktor resiko yang dapat menyebabkan penyakit yang berkaitan dengan artherosklerosis, seperti penyakit jantung koroner, iskemik pembuluh cerebral, serta penyakit pembuluh darah perifer[(8)]. Penyakit jantung koroner sendiri merupakan penyebab utama mortalitas dan morbiditas di negara-negara maju dan berkembang[(9)]. Berdasarkan

data yang dikemukakan oleh WHO, pada tahun 2004 angka kematian akibat penyakit jantung koroner adalah 17,1 juta orang dan diperkirakan angka kematian ini akan meningkat pada tahun 2030 menjadi 23,6 juta orang[10].

Terapi hiperlipidemia yang biasa digunakan adalah meliputi pengaturan diet konsumsi lemak, olahraga, dan penggunaan obat-obatan[11]. Sebagian besar obat antihiperlipidemia yang beredar di pasaran saat ini adalah obat golongan statin (lovastatin, pravastatin, simvastatin, fluvastatin, dan atorvastatin) dan golongan asam fibrat (gemfibrozil, fenofibrat, klofibrat)[8]. Obat-obatan antihiperlipidemia tersebut terbukti efektif dalam menurunkan konsentrasi lemak dalam darah (LDL), namun penggunaan dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Obat golongan statin misalnya obat ini memiliki efektifitas yang tinggi namun memiliki efek samping diantaranya, dapat menimbulkan gangguan pencernaan, sakit kepala, *mialgia*, ruam kulit dan jika digunakan dalam jangka panjang kemungkinan dapat menimbulkan efek toksik kronis[12]. Sehingga kemudian di cari pengobatan alternatif yang memiliki efek samping rendah atau tidak ada sama sekali. Pengobatan alternatif yang banyak digunakan oleh masyarakat saat ini adalah obat yang berasal dari bahan alam.

Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional telah diterima dan digunakan secara luas di dunia[13]. Pengobatan obat tradisional dianggap lebih aman dari penggunaan obat-obat kimia. Hal ini disebabkan karena obat-obat tradisional memiliki efek samping yang relatif sedikit daripada obat-obat dari bahan kimia (obat sintetik)[14]. Salah satu tanaman yang telah banyak dipergunakan sebagai anti kolesterol di masyarakat dan telah banyak diproduksi dalam sediaan kapsul adalah jintan hitam (*Nigella sativa L.*).

Jintan hitam umumnya dikenal sebagai *black seed* atau *black cumin*, merupakan *family Ranunculaceae.* Jintan hitam telah digunakan untuk pengobatan dan juga sebagai asupan gizi di banyak negara Timur Tengah dan di negara-negara lain di dunia[15]. Telah banyak dilakukan penelitian tentang jintan hitam, salah satunya yaitu pada ekstrak etanol dari biji jintan hitam yang menunjukkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan aktivitas antitumor[16]. Pada salah satu penelitian menyebutkan jintan hitam telah menunjukkan aktivitas

hipokolesterolmia[17]. Selain itu pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ekstrak jintan hitam dapat menghambat proses terbentuknya lemak di dinding arteri (atherogenesis), lemak didinding arteri ini lama-kelamaan akan berkembang menjadi artheroslerosis (salah satu penyebab artherosclerosis adalah hiperlipidemia) [32]. Dimana jintan hitam mengandung vitamin E, senyawa alkaloid (*nigellamines)*[42] dan *thymoquinone* yang bersifat sebagai antioksidan yang memiliki pengaruh signifikan pada perubahan metabolisme lipid[32].

Hingga saat ini belum ada penelitian secara spesifik terhadap ekstrak jintan hitam yang digunakan sebagai terapi preventif hiperlipidemia. Selain itu pada penelitian sebelumnya tidak dijelaskan mengenai standarisasi dari ekstrak jintan hitam yang digunakan. Standarisasi merupakan parameter prosedur dari cara pengukuran yang hasilnya merupakan mutu dalam artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi, farmasi), termasuk jaminan (batas-batas) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya[26]. Karena hal inilah perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas ekstrak jintan hitam terstandar sebagai upaya preventif hiperlipidemia.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka permasalahan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah apakah ekstrak serbuk jintan hitam (*Nigella sativa L.*) memiliki aktivitas sebagai upaya preventif hiperlipidemia pada mencit yang diinduksi *poloxamer.*

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak serbuk jintan hitam (*Nigella sativa L.)* sebagai upaya preventif hiperlipidemia yang diujikan pada mencit jantan yang diinduksi *poloxamer,* dengan parameter kadar kolesterol dan trigliserida darah.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai :

1. Salah satu sumber informasi masyarakat tentang efek farmakologi biji jintan hitam (*Nigella sativa L.)* dengan aktivitasnya sebagai upaya preventif hiperlipidemia, yaitu mampu menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Sehingga dapat meminimalisasi terjadinya kejadian hiperlipidemia di Indonesia.
2. Informasi yang diharapkan dapat menambah khasanah informasi obat alami yang dapat digunakan untuk pengembangan ilmu pengetahuan dibidang kesehatan.

BAB II
STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Jintan hitam

Tanaman ini dikenal dengan nama latin *Nigella sativa* Linnaeus varietas hispidula (brachyloba), yang merupakan spesies tumbuhan semak rendah yang termasuk famili *Racunculaceae*[18]. Berdasarkan ilmu taksonomi dan klasifikasi tumbuhan jintan hitam dikelompokkan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Ranunculales
Family : Ranunculaceae
Genusa : *Nigella*
Species : *Nigella sativa L.*[19]



Gambar 1. Biji jintan hitam[20].

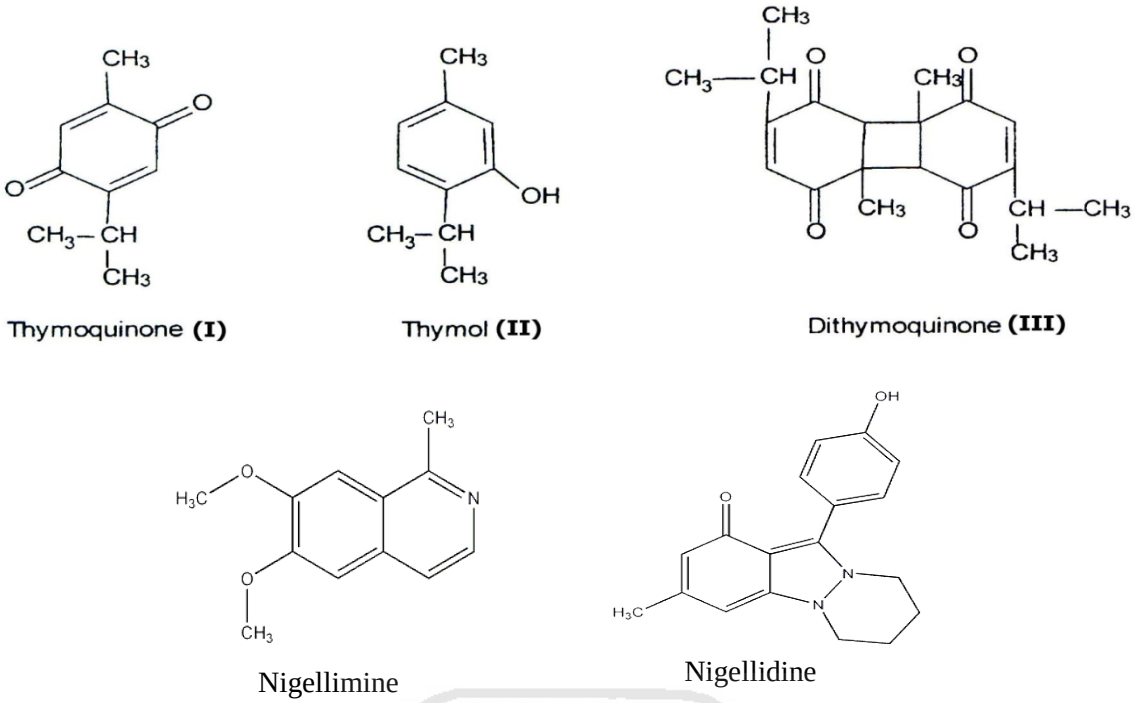
Jintan hitam banyak ditemukan diberbagai tempat di dunia, dari daerah timur mediterania hingga di selatan india. Tanaman ini banyak dibudidayakan di daerah Mesir, Timur Tengah (Saudi Arabia), Turki, Sri Langka, Kenya, Sudan, Afghanistan, Eropa, sebagian Asia dan di banyak negara lainnya[20]. Karena tersebar luas di dunia maka jintan hitam banyak dikenal dengan berbagai nama lain seperti *Kalonji, Azmut, Gurat, Aof, Aosetta* (Urdu, Pakistan, India, Sri langka), *Habbat Albarakah atau Habbatus sauda'* (Arab Saudi),

sedangkan di Inggris dan Amerika dikenal sebagai *Black cumin* atau *Black Caraway*[18,19,21].

Jintan hitan adalah tanaman berbunga tahunan, asli dari barat daya Asia. Tingginya hingga 20-30 cm (7,9-12 dalam). Bunganya lembut, biasanya berwarna biru dan putih pucat, dengan 5-10 kelopak. Jintan hitam pahit adalah biji *Nigella sativa* L. Kadar minyak atsiri tidak kurang dari 0,2% v/b. Berbau khas aromatik, rasa pahit. Biji agak keras, bentuk limas ganda dengan kedua ujungnya meruncing, limas yang satu lebih pendek dari yang lain, bersudut 3 sampai 4, panjang 1,5 mm sampai 2 mm, lebar lebih kurang 1 mm, permukaan luar berwarna hitam kecoklatan, hitam kelabu sampai hitam, berbintik-bintik, kasar, berkerut, kadang-kadang dengan beberapa rusuk membujur atau melintang. Pada penampang melintang biji terlihat kulit biji berwarna coklat kehitaman sampai hitam, endosperm berwarna kuning kemerahan, kelabu, atau kelabu kehitaman, lembaga berwarna kuning pucat sampai kelabu[18,19,20].

Secara empiris jintan hitam banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti asma, hipertensi, diabetes melitus, hiperkolesterolmia, inflamasi, arthtritis, tumor, gangguan pencernaan, gangguan ginekologi, gangguan sistem imun selama lebih dari 2000 tahun[22,23,24]. Jintan hitam juga banyak digunakan sebagai bumbu dapur dan pengaroma yang ditambahkan pada teh atau kopi. Selain itu biji jintan hitam dapat dicampur dengan madu atau ditaburkan pada salad[24].

Penelitian-penelitian sebelumnya telah menunjukkan jintan hitam memiliki lebih dari 100 senyawa kimia yang berbeda seperti alkaloid, flavonoid, asam organik, tannin, saponin, asam amino (albumin, globulin, lisin, leusin), gula tereduksi, vitamin (asam folat, asam askorbat, tiamin, niasin, piridoksin), selain itu kandungan lain dari jintan hitam adalah minyak volatile yang berwarna kuning, minyak campuran dan protein[18].



Gambar 2. Struktur kimia senyawa yang terkandung dalam jintan hitam[51,52].

Minyak volatile jintan hitam mengandung beberapa zat kimia, yaitu *thymoquinone, dithymoquinone, thymol* (struktur kimia ditunjukkan pada gambar 2), *thymohydroquinone,* dan *nigellone. Thymoquinone* dan *nigellone* memiliki aktivitas farmakologi sebagai antioksidan, yang telah dibuktikan dapat digunakan sebagai pencegahan penyakit jantung. Selain itu *thymoquinone* juga memiliki aktivitas sebagai antimikroba, hipoglikemik, antitumor, dan efek hepatoprotektif[25]. Senyawa lainnya yang terkandung dalam jintan hitam adalah alkaloid. Jenis alkaloid yang terkandung dalam jintan hitam adalah *nigelicine, nigellimine N-oxide* dan *nigellimine, nigellidine* (struktur kimia ditunjukkan pada gambar 2) beserta alkaloid *nigellamine* [18].

2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, *alkaloid, flavonoid* dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-

senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat[26].

Pemilihan metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi[27].

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya[26].

Faktor-faktor yang mempengaruhi maserasi adalah perbandingan simplisia-pelarut, proses pelarutan zat dari sel yang terdisintegrasi, inhibisi dari simplisia, proses pelarutan dari sel utuh, kecepatan tercapainya keseimbangan, temperatur, pH, interaksi antara konstituen pelarut dan struktur bahan, lipofilisitas (dalam hal menggunakan pelarut campur)[28].

3. Esktrak terstandar

Standardisasi dalam kefarmasian tidak lain adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma mutu kefarmasian, mutu dalam artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi, dan farmasi), termasuk jaminan (batas-batas) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya. Pengertian standarisasi juga berarti proses menjamin bahwa produk akhir (obat, ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter yang konstan (ajeg) dan ditetapkan (dirancang dalam formula terlebih dahulu[26].

Standardisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan

yang tercantum dalam monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (Materia Medika Indonesia)[26] .

Dalam bentuk bahan dan produk kefarmasian baru, yaitu ekstrak maka selain persyaratan monografi bahan baku (simplisia) juga diperlukan persyaratan mutu ekstrak terdiri dari berbagai parameter standar umum dan parameter standar spesifik [26].

Parameter standar umum terdiri dari parameter susut pengeringan, parameter bobot jenis, parameter kadar air, parameter kadar abu, parameter sisa pelarut, parameter residu pestisida, parameter cemaran logam berat, parameter cemaran mikroba dan yang terakhir adalah parameter cemaran kapang, khamir dan aflatoksin. Sedangkan parameter standar spesifik terdiri dari parameter identitas ekstrak, parameter organoleptik ekstrak dan parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu[26].

Untuk parameter kandungan senyawa kimia metode yang digunakan adalah kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi adalah suatu nama yang diberikan untuk teknik pemisahan tertentu[29]. Teknik pemisahan dalam kromatografi ini menggunakan fase diam (*stationary phase)* dan fase gerak (*mobile phase).* Saat ini kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling umum dan paling sering digunakan dalam bidang kimia analisis dan dapat dimanfaatkan untuk melakukan analisis, baik analisis kualitatif maupun kuantitatif, atau preparatif dalam bidang farmasi, lingkungan, industri dan sebagainya[30].

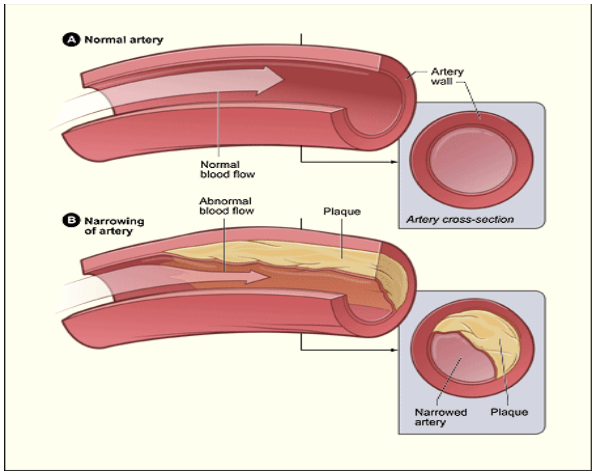
Kromatografi lapis tipis adalah suatu analisis kualitatif suatu sampel yang ingin dideteksi dengan memisahkan komponen-komponen sampel berdasarkan perbedaan kepolarannya. Prinsip kerja dari kromatografi lapis tipis adalah memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dalam bentuk plat silika dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan[31].

4. Hiperlipidemia

Di dalam darah ditemukan tiga jenis lipid yaiu kolesterol, trigliserida dan fosfolipid. Sifat lipid adalah sukar larut dalam lemak sehingga dibutuhkan suatu zat pelarut yang berupa protein yang dikenal dengan apolipoprotein. Senyawa lipid dengan apolipoprotein disebut sebagai lipoprotein. Lipoprotein berbentuk sferik dan terdiri dari kolesterol, trigliserid, fosfolipid dan apoprotein. Saat ini dapat dibedakan enam jenis lipoprotein, yaitu : *high-density-lipoprotein* (HDL), *low-density-lipoprotein* (LDL), *intermediete-density-lipoprotein* (IDL), *very low density lipoprotein (*VLDL), kilomikron dan lipoprotein a kecil)[43].

Hiperlipidemia adalah peningkatan salah satu atau lebih kolesterol ester, fosfolipid atau trigliserida[2] atau dapat dinyatakan sebagai kondisi ketidaknormalan dimana terjadi peningkatan konsentrasi dari beberapa atau semua lipid dan atau lipoprotein dalam darah[3]. Hiperlipidemia menjadi penyebab berbagai macam penyakit-penyakit serius seperti atherosklerosis, hipertensi, obesitas, diabetes, penurunan fungsi beberapa organ tubuh dan beberapa penyakit lain [6].

Atherosklerosis merupakan sebuah penyakit dimana terdapat plaq di dalam arteri. Arteri merupakan pembuluh darah yang membawa darah kaya oksigen ke jantung dan organ-organ lain dalam tubuh[44] . Plaq terbentuk dari zat lemak, kolesterol, kalsium, protein seperti fibrin dan zat lain yang ditemukan di darah[45]. Dari waktu ke waktu, plaq akan mengeras dan kemudian akan menyempitkan arteri, lalu akan membatasi aliran darah yang kaya akan oksigen ke organ-organ dan bagian-bagian lain tubuh. Hal ini akan menyebabkan masalah serius, termasuk serangan jantung, stroke atau bahkan kematian[44]. Pada gambar 3 dapat dilihat perbedaan arteri normal (A) dengan arteri dengan penumpukan plaq (B). Arteri yang mengalami penumpukan plaq didalamnya lama-kelamaan akan mengalami penyumbatan dan akan menghalangi jalan aliran darah dan menyebabkan aliran darah tidak normal.

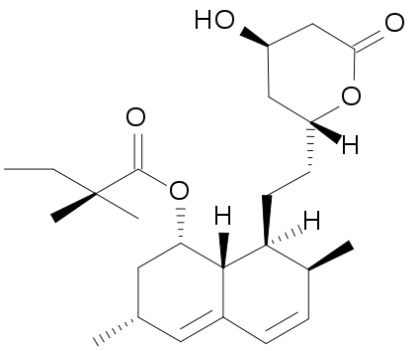


Gambar 3. Perbandingan arteri normal (A) dengan arteri dengan penumpukan plaq (B) [44].

Selain itu hiperlipidemia juga merupakan faktor resiko yang dapat menyebabkan penyakit yang berkaitan dengan artherosklerosis, seperti penyakit jantung koroner, iskemik pembuluh cerebral, serta penyakit pembuluh darah perifer[8]. Berdasarkan data yang dikemukakan oleh WHO, pada tahun 2004 angka kematian akibat penyakit jantung koroner adalah 17,1 juta orang dan diperkirakan angka kematian ini akan meningkat pada tahun 2030 menjadi 23,6 juta orang[10].

a. Terapi hiperlipidemia

Terapi hiperlipidemia yang biasa digunakan adalah meliputi pengaturan diet konsumsi lemak, olahraga, dan penggunaan obat-obatan[11]. Sebagian besar obat antihiperlipidemia yang beredar di pasaran saat ini adalah obat golongan asam fibrat (gemfibrozil, fenofibrat, klofibrat) dan golongan statin (lovastatin, pravastatin, simvastatin, fluvastatin, dan atorvastatin) [8]. Berikut adalah gambar struktur kimia simvastatin.



Gambar 4. Struktur simvastatin[3

Obat-obat golongan statin sangat efektif dalam menurunkan angka kejadian penyakit koroner dan mortalitas total. Statin terbukti mempunyai sedikit efek samping dan saat ini merupakan obat pilihan pertama. Obat-obat golongan statin bekerja dengan menghambat biosintesis kolesterol (menghambat kerja enzim HMG-CoA reduktase). Penurunan biosintesis kolesterol hingga ke tingkat reseptor LDL mengakibatkan umpan balik positif untuk menurunkan kadar kolesterol dalam serum[45]. Salah satu obat golongan statin yang banyak dikonsumsi adalah simvastatin.

5. Uji antihiperlipidemia

a. Induksi *poloxamer*

Beberapa uji in vitro dan in vivo telah banyak dilakukan untuk meneliti mekanisme hiperlipidemia. Kini telah dikembangkan bebebrapa cara untuk membuat hewan uji menjadi hiperlipidemia. Beberapa bahan kimia tertentu memiliki potensi untuk menyebabkan hiperlipidemia, bahan kimia tersebut harus dikonsumsi selama periode yang panjang. Salah satu contoh senyawa tersebut adalah *Poloxamer* 407 (Pluronic®-M 127, P-407) yang telah terbukti dapat menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam kolesterol plasma dan trigliserida dalam berbagai model binatang, seperti tikus[36-37], mencit[38-40] dan kelinci[41].

Poloxamer 407 merupakan surfaktan non-ionik hidrofilik, dan umumnya dikenal sebagai poloxamer kopolimer. *Poloxamer* 407 adalah triblok kopolomer yang terdiri dari sebuah gugus utama hidrofobik glikol polypropylene yang diapit oleh dua gugus hidrofilik glikol polietilen[35]. Keuntungan dari penggunaan *poloxamer* adalah waktu peningkatan total kolesterol yang relatif cepat (sekitar 2 minggu) dan cukup memberikan gambaran mengenai kenaikan total kolesterol dan trigliserida dalam darah. Mekanisme kerjanya adalah dengan menginduksi kolesterolgenesis dengan meningkatkan enzim HMG-CoA reduktase dan menekan ekspresi LDL reseptor[46].

b. Reagen uji hiperlipidemia

(1)Reagen Kolesterol (Fluitest® Chol)

Kolesterol merupakan sebuah steroid dengan gugus hydroxyl sekunder pada posisi C_3. Kolesterol disintesis dibanyak jenis jaringan, namun paling banyak disintesis di hepar dan dinding usus. Sintesis kolesterol ini bersumber dari asupan makanan yang diterima tubuh setiap harinya[(34)].

Pemeriksaan kadar kolesterol dalam tubuh digunakan untuk mengetahui resiko *atherosclerosis*, mendiagnosis kemudian pengobatan yang diberikan kepada keadaan pasien yang melibatkan peningkatan kadar kolesterol yang disertai adanya gangguan metabolisme lipid dan lipoprotein[(34)].

Metode pengukuran kadar kolesterol ini didasari pada penetapan perubahan *cholestenone* setelah pembelahan enzimatik pada ester kolesterol dengan perubahan kolesterol esterase dari kolesterol menjadi kolesterol oksidase, kemudian pengukuran berikutnya dengan reaksi Thinder dalam bentuk hidrogen peroksida. Optimasi dari pembelahan ester (>99,5 %) memungkinkan standarisasi menggunakan standar primer dan sekunder dan perbandingan langsung dengan CDC dan metode referensi NIST. Pemeriksaan kolesterol Biocon® memenuhi tujuan dari *Nation Institute of Health* (NIH) kurang dari atau sama dengan 3 % untuk kedua presisi dan bias[(34)].

Prinsip mekanisme kerja dari reagen ini adalah pewarnaan secara enzimatis. Ketika sampel ditambah R1 (reagen kolesterol) akan mulai terjadi reaksi :

Kolesterol ditetapkan secara enzimatis menggunakan kolesterol esterase dan kolesterol oksidase.

$$\textit{Cholestin ester} + H_2O \xrightarrow{\textit{Cholesterol esterase}} \textit{Cholesterol} + \text{fatty acids}$$

Kolesterol ester dipotong oleh aksi atau kolesterol esterase menghasilkan kolesterol bebas dan asam lemak.

$$\textit{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\textit{Cholesterol oxidase}} \textit{Cholesten}\text{-3-on} + H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 + \textit{Phenol} + 4\text{-}\textit{Aminoantipyrine} \xrightarrow{\textit{Peroksidase}} \text{pewarna } \textit{quinoeimin} + 4\ H_2O$$

Kolesterol diubah oleh oksigen dengan bantuan kolesterol oksidase menjadi cholest-4-en 3-one dan hidrogen peroksidase. Hidrogen peroksidase

membentuk zat warna merah dengan bereaksi dengan 4-*Aminoantipyrine* dan fenol dibawah katalisis dari peroksidase. Intensitas warna secara langsung sebanding dengan konsentrasi kolesterol dan bisa ditetapkan secara fotometri[34].

Kandungan pada reagen kolesterol (R1) ini adalah sebagai berikut :

Tabel I. Kandungan reagen kolesterol (Fluitest® Chol) [34].

Kandungan senyawa	Konsentrasi
Pipes buffer, pH 6,9	90 mmol/l
Fenol	26 mmol/l
Cholesterol oxidase	200 U/l
Cholesterol Esterase	300 U/l
Peroxidase	1250 U/l
4-*Aminoantipyrine*	0,4 mmol/l

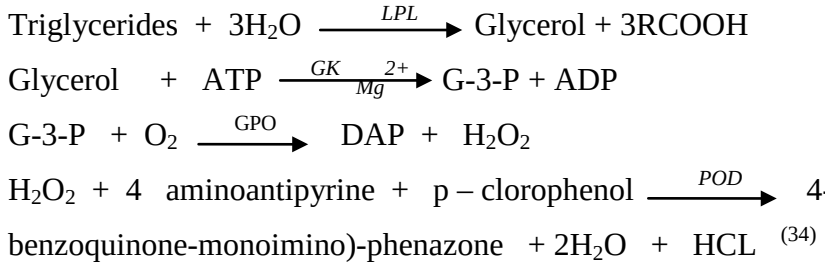
(2)Reagen trigliserida (Fluitest® TG)

Trigliserida adalah ester dari *trihydric alchohol glucerol* dengan 3 rantai asam lemak. Trigliserida sebagian disintetis dihepar dan sebagian lagi berasal dari asupan makanan[34].

Penetapan kadar trigliserida sering digunakan untuk mendiagnosis dan pengobatan pasien yang menderita diabetes melitus, nephrosis, gangguan hepar, gangguan metabolisme lemak, dan penyakit gangguan endokrin (yang berhubungan dengan hormon) [34].

Metode pengukuran ini didasari oleh penelitian dari Wahlefed yang menggunakan lipoprotein lipase yang berasal dari mikroorganisme untuk hidrolisis cepat dan lengkap dari trigliserida menjadi gliserol diikuti dengan oksidasi untuk fosfat dihidroksiaseton dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksidase yang dihasilkan kemudian bereaksi dengan 4-aminophenazon dan 4-chlorophenol dibawah katalisis dari peroksidase membentuk warna merah (reaksi akhir Trinder) [34].

Prinsip mekanisme kerja dari reagen ini adalah pewarnaan secara enzimatis, yaitu :



(34)

Kandungan pada reagen trigliserida (R1) ini adalah sebagai berikut :

Tabel II. Kandungan reagen trigliserida (Fluitest® TG) (34).

Kandungan senyawa	Konsentrasi
Pipes buffer, pH 7,8	50 mmol/l
p-klorofenol	2 mmol/l
Lipoprotein Lipase	150000 U/l
Gliserolkinase	800 U/l
Gliserol-3-P-oxidase	4000 U/l
Peroxidase	440 U/l
4-*Aminoantipyrine*	0,7 mmol/l
ATP	0,3 mmol/l
Mg^{2+}	40 mmol/l
Na-*cholat*	0,20 mmol/l
Kalium-*Hexacyanoferrat* (II)	1µmol/l

B. Landasan Teori

Ketidaknormalan metabolisme lemak merupakan penyebab berbagai macam penyakit-penyakit serius seperti atherosklerosis, hipertensi, obesitas, diabetes, penurunan fungsi beberapa organ tubuh dan beberapa penyakit lain. Hiperkolesterolmia dan hipertrigliserida merupakan faktor resiko utama (salah satu atau keduanya) yang dapat mempercepat pembentukan aterosklerosis dan juga keparahannya.Selain itu hiperlipidemia juga merupakan faktor resiko yang dapat menyebabkan penyakit yang berkaitan dengan arterosklerosis, seperti penyakit jantung koroner, iskemik pembuluh cerebral, serta penyakit pembuluh darah perifer.

Salah satu tanaman yang telah banyak dipergunakan sebagai anti kolesterol di masyarakat dan telah banyak diproduksi dalam sediaan kapsul adalah jintan hitam (*Nigella sativa,* L.). Beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menyatakan bahwa jintan hitam mengandung vitamin E, senyawa alkaloid (*nigellamines)* dan *thymoquinone* yang bersifat sebagai antioksidan yang memiliki pengaruh signifikan pada perubahan metabolisme lipid. Pada penelitian lain menyebutkan bahwa jintan hitam mampu menghambat proses terbentuknya lemak di dinding arteri (atherogenesis), yang dapat berkembang menjadi artherosklerosis. Namun, belum ada penelitian sebelumnya yang spesifik terhadap pencegahan dan pengatasan hiperlipidemia. Sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut terkait efek jintan hitam sebagai terapi prenventif hiperlipidemia dengan menggunakan esktrak terstandar.

C. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori tersebut diatas maka dapat disusun suatu hipotesis bahwa ekstrak serbuk jintan hitam *(Nigella sativa L.)* mempunyai aktivitas sebagai penurun kadar kolesterol sehingga dapat digunakan sebagai upaya preventif hiperlipidemia dengan parameter yang digunakan adalah kadar kolesterol dan trigliserida pada hewan uji.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

a. Bahan ekstraksi

Bahan baku utama (primer) yang diperlukan dalam penelitian ini adalah serbuk kering jintan hitam (*Nigella sativa* L.) yang diperoleh dari Ihya Rumah Herbal Yogyakarta yang berasal dari Yaman dan bahan lain (sekunder) yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah etanol (E-Merck).

b. Bahan uji standarisasi

Untuk pengujian kandungan senyawa aktif (uji kromatografi lapis tipis) untuk pengujian senyawa alkaloid digunakan fase diam silica gel GF254 dan fase gerak yang digunakan fase gerak methanol : amoniak (100:1,5). Sedangkan untuk pengujian bobot jenis dan organoleptis diperlukan ekstrak jintan hitam.

c. Bahan uji hiperlipidemia

Hewan uji hiperlipidemia yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor mencit jantan galur *balb/c* yang berumur 1,5 bulan dengan berat badan 22-35 gram yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT-UGM) Yogyakarta dan diberi minum *ad libitum.* Selain itu bahan lain yang dibutuhkan adalah *poloxamer*, reagen kolesterol dan trigliserida (Fluitest® CHOL dan Fluitest® TG)., aquades, kertas timbang, microtip (*yellow* dan *blue tip)*, masker, sarung tangan, spuit injeksi, spuit oral, serta simvastatin.

2. Alat

a. Alat ekstraksi :

Alat-alat yang digunakan dalam melakukan proses ekstraksi meliputi : seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator*, dan alat-alat gelas (labu takar, gelas beker, gelas ukur).

b. Alat uji standarisasi :

Alat-alat yang digunakan adalah cawan porselen, gelas beaker, piknometer, bejana untuk penjenuhan KLT.

c. Alat uji hiperlipdemia

Alat-alat yang digunakan dalam uji hiperlipidemia adalah alat-alat gelas (labu takar, gelas beker, gelas ukur, dan pipet), timbangan analitik bahan (Metler Toledo type 303) , timbangan hewan (EK-1200A AND), penangas air, sentrifuge (Heraeus-Sepatech), vortex (Maxi-mix Thermolyne), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-280), *eppendorf*, dan seperangkat alat bedah hewan.

B. Cara Penelitian

a. Pembuatan ekstrak jintan hitam

Serbuk jintan hitam ditimbang seberat 500 gram kemudian masukkan ke dalam toples dan rendam dengan 1500 ml etanol 80%. Dilakukan perendaman selama 24 jam, lalu disaring menggunakan corong *Buchner*. Dan dari sisa serbuk jintan hitam pada proses maserasi sebelumnya di lakukan remaserasi selama 24 jam. Setelah didapat ekstrak etanol jintan hitam lalu dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak jintan hitam.

b. Penetapan Parameter Standar Ekstrak

1) Uji organoleptis

Uji organoleptis ini bertujuan sebagai pengenalan awal yang sederhana namun dapat dilakukan seobyektif mungkin. Uji ini dilakukan dengan menggunakan panca indra kemudian mendeskripsikan ekstrak yang diamati. Kriteria yang dinilai adalah bentuk, bau , rasa dan warna dari ekstrak [(26)].

2) Uji bobot jenis

Uji bobot jenis ini bertujuan untuk memberikan batasan tentang besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang. Uji ini dilakukan dilakukan dengan menggunakan alat khusus yaitu piknometer[(26)].

Piknometer yang digunakan adalah piknometer yang bersih, kering dan telah dikaliberasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25^0C. Suhu ekstrak cair diatur hingga lebih kurang 20^0C, kemudian dimasukkan ke dalam piknometer. Piknometer diatur suhunya hingga suhu 25^0C, lalu dibuang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dengan piknometer pada suhu 25^0C[(26)].

3) Uji Kandungan senyawa aktif

Tujuan dari uji ini adalah memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan kromatogram. Pada awalnya ekstrak ditimbang, lalu diekstraksi dengan pelarut dan cara tertentu. Kemudian dilakukan analisis kromatografi sehingga memberikan pola kromatogram yang khas[(26)]. Pengujian kandungan senyawa aktif ini dilakukan di LPPT-UGM.

Senyawa yang akan menjadi fokus utama dalam proses analisis ini adalah alkaloid. Senyawa ini merupakan senyawa aktif dalam jintan hitam yang berperan dalam proses penurunan kadar kolesterol. Untuk senyawa alkaloid dilakukan pengujian secara kualitatif dengan menggunakan metode KLT (Kromatrografi Lapis Tipis).

Untuk pengujian senyawa alkaloid, fase diam yang digunakan adalah *Silica Gel* 60 F_{254} dan fase gerak metanol : amoniak (100:1,5), pembanding ekstrak yang digunakan adalah *Quinine*. Langkah awal adalah dengan cara mencampurkan ekstrak jintan hitam sebanyak 200 µl dengan 2 mL amoniak 10%, kemudian di*vortex* selama 2 menit lalu tambahkan 2 mL Kloroform kemudian di*vortex* kembali dan disentrifugasi selama 3 menit, dari proses ini diambil fase kloroform. Kemudian uapkan fase kloroform dengan gas nitrogen. Setelah itu larutkan kembali dalam 200 µl, lalu spoting sampel sebanyak 20 µl dan ditotolkan pada *plate*, kemudian dimasukkan dalam bejana yang berisi fase gerak untuk tahap elusidasi. Setelah elusi 8,5 cm, plate diangkat dan dikeringkan. Kemudian disemprot dengan pereaksi *Dragendorff*, dan dilakukan

deteksi bercak di bawah sinar tampak dan lampu UV panjang gelombang 254 dan 366 nm.

c. Induksi hiperglikemia pada mencit

Senyawa kimia yang digunakan untuk membuat mencit hiperlipidemia adalah *poloxamer*, karena obat ini relatif cepat menimbulkan hiperlipidemia (yang ditandai dengan kenaikkan kadar kolesterol 10 x lipat kadar kolesterol normal). Dosis *poloxamer* yang digunakan adalah 400 mg/kgBB. perhitungan dosis *poloxamer* adalah sebagai berikut :

$$400 \text{ mg/kgBB} = \frac{400 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} = \frac{8 \text{ mg}}{20 \text{ g}}$$

$$= \frac{8 \text{ mg}}{0{,}2 \text{ ml}} = \frac{2 \text{ g}}{50 \text{ ml}}$$

Pemejanan *poloxamer* dilakukan pada hari terakhir penelitian (hari ke 15) yang diberikan melalui intraperitonial untuk mengurangi perbedaan variabilitas sebelum diambil sampling darah dipuasakan 18 jam dengan tetap diberi air minum.

d. Pembuatan larutan stok

1) Dosis ekstrak jintan hitam

Dosis ekstrak jintan hitam yang digunakan adalah 250 mg/kg BB dan 500 mg/kgBB. Dosis ini didapatkan dari penelitian sebelumnya (Al-Naqeeb.*et al.*, 2010) yang menggunakan hewan uji kelinci[(32)]. Namun sebelumnya dosis dikonversikan terlebih dahulu ke dosis hewan uji yang digunakan yaitu mencit. Dengan perhitungan sebagai berikut :

Untuk dosis ekstrak jintan hitam 250 mg :

250 mg / kgBB = 375 mg / 1,5 kg

375 mg / 1,5 kg x 0,04 = 15 mg / 20 gram ~ 15mg/0,2 ml

Untuk dosis ekstrak jintan hitam 500 mg :

500 mg / kgBB = 750 mg / 1,5 kg

750 mg / 1,5 kg x 0,04 = 30 mg / 20 gram ~ 30mg/0,2 ml

Volume pemejanan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu 0,2 ml pada mencit dengan berat rata – rata 20 gram. Sehingga 20 gr ~ 0,2 ml. Sehingga total kebutuhan larutan stok selama 3 hari yaitu: 5 (mencit) x 3 (hari) x 0,2 (ml) = 3ml

Untuk dosis ekstrak jintan hitam 250 mg :

15 mg/0,2 ml = 225 mg/3 ml, tetapi karena labu ukur yang tersedia 10 ml larutan stok menjadi 750 mg/10 ml.

Untuk dosis ekstrak jintan hitam 500 mg :

30 mg/0,2 ml = 450 mg/3 ml, labu ukur yang tersedia 10 ml sehingga larutan stok dibuat dalam 1500 mg/10 ml.

2) Dosis simvastatin

Obat pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah simvastatin dengan dosis 10mg/70 kg. Sebelum digunakan pada hewan uji dosis simvastatin dikonversikan terlebih dahulu pada dosis hewan uji (mencit) dengan perhitungan sebagai berikut :

10 mg/ 70 kg x 0,0026 = 0,026 mg / 20 gram

Dari dosis diatas maka larutan stok yang perlu dibuat untuk pemberian volume pemejanan 0,2 ml untuk mencit dengan berat badan 20 gram. Sehingga volume pemejanan untuk 3 hari = 0,2 ml x 3 hari x 5 mencit = 3 ml.

Larutan Stok = 0,026 mg / 0,2 ml
= 0,39 mg / 3 ml
= 1,3 mg / 10 ml

Bobot per tablet 100 mg, jadi stok yang dibuat adalah

= 1,3 mg / 10 ml x 100 mg / 10 mg

= 1,3 g / 10 ml

Jadi tablet simvastatin digerus dan serbuk ditimbang 13 mg kemudian dilarutkan dalam 10 ml larutan Na CMC.

e. Perlakuan pada hewan uji

Sebanyak 25 ekor mencit jantan galur *Balb-c* yang berumur 1,5 bulan dengan berat badan 22-35 gram. Mencit-mencit tersebut dikondisikan selama satu minggu untuk proses adaptasi dan diberi makan dan minum *ad libitum*.

Dan kemudian dibagi menjadi lima kelompok, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit yang terdiri dari :

Kelompok I : diberi aquadest, tanpa induksi *poloxamer*

Kelompok II : diberi aquadest dan diinduksi *poloxamer*

Kelompok III : simvastatin 10 mg/70 kg

Kelompok IV : diberi ekstrak jintan hitam 750 mg/KgBB mencit dan diinduksi *poloxamer*

Kelompok V : diberi ekstrak jintan hitam 1500 mg/kgBB mencit dan diinduksi *poloxamer*

Kelompok I adalah kelompok normal, dimana pada kelompok ini mencit diberi aquadest. Kelompok II merupakan kelompok normal, pada kelompok ini mencit juga diberikan aquadest. Kelompok III adalah kelompok reference, pada kelompok ini mencit mendapat perlakuan pemberian obat pembanding yaitu simvastatin. Pada kelompok IV dan V merupakan kelompok perlakuan yang diberikan estrak tanaman uji, dimana pada kelompok IV diberikan ekstrak jintan hitam dengan dosis 750 mg/KgBB dan pada kelompok V diberikan ekstrak jintan hitam dengan dosis 1500 mg/KgBB. Kelompok I yang merupakan kelompok mencit normal pada hari ke-14 tidak diinduksi poloxamer, sedangkan ke-4 kelompok lainnya diinduksi dengan poloxamer pada hari ke-14.

f. Metode analisis serum (pengukuran profil lipid)

Pada hari terakhir, mencit dikorbankan dengan cara anastesi menggunakan eter yang over dosis, dibedah bagian perutnya dan darah diambil dari vena lateral (gambar 5). Darah yang didapat kemudian di*sentrifuge* pada 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serum.



Gambar 5. Pengambilan darah dari vena lateral

Kemudian dilakukan penetapan kadar total kolesterol dan trigliserida serum. Prosedur penetapan dilakukan sebagai berikut :

1) Pengukuran total kolesterol

Tabung reaksi disiapkan, kemudian diberi label yang sesuai. Pada label sampel / standart ditambahkan 10 µl serum uji dan 1000 µl reagen kolesterol kemudian dicampur hingga homogen. Sedangkan pada tabung reaksi berlabel blanko hanya ditambahkan 1000 µl reagen kolesterol. Kemudian semua tabung reaksi diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37^0C atau selama 10 menit pada suhu 20^0C hingga 25^0C. Absorbansi sampel, standart dan blanko dibaca dalam waktu 60 menit. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 546 nm (500-550 nm)[34]. Kemudian dapat dihitung kadar kolesterol dengan menggunakan rumus:

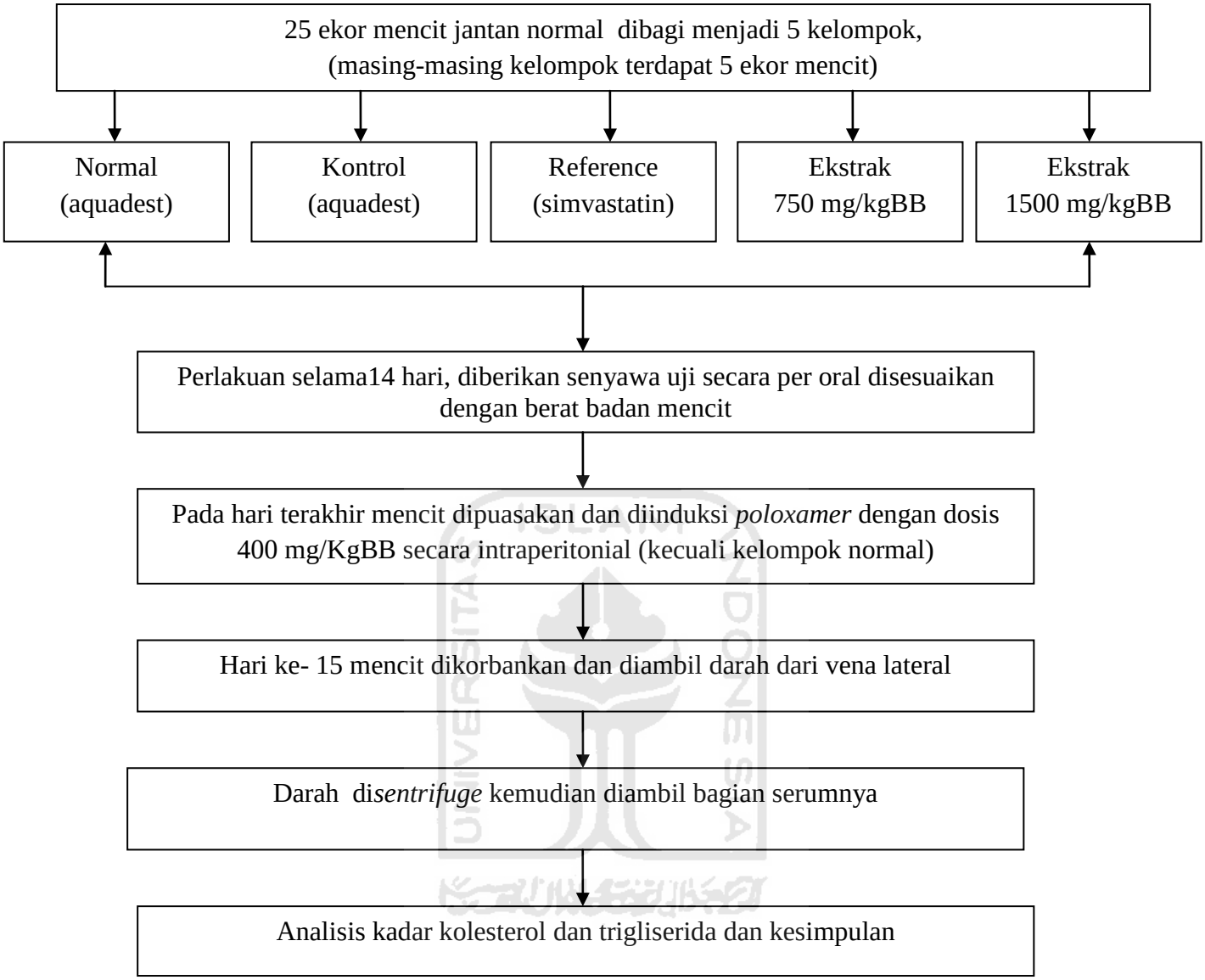
$$\text{Konsentrasi kolesterol} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \text{ x konsentrasi standar}$$

2) Pengukuran trigliserida

Tabung reaksi disiapkan, kemudian diberi label yang sesuai. Pada label sampel / standart ditambahkan 10 µl serum uji dan 1000 µl reagen trigliserida kemudian dicampur hingga homogen. Sedangkan pada tabung reaksi berlabel blanko hanya ditambahkan 1000 µl reagen kolesterol. Kemudian semua tabung reaksi diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37^0C atau selama 10 menit pada suhu 20^0C hingga 25^0C. Absorbansi sampel, standart dan blanko dibaca dalam waktu 60 menit. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 546 nm (500-550 nm) [34]. Kemudian dapat dihitung kadar kolesterol dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi trigliserida} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \text{ x konsentrasi standar}$$

C. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema penelitian

D. Analisis Data

Metode analisis data menggunakan perangkat lunak SPSS® 16 pada sistem operasi Windows menggunakan uji *one way* Anova. Metode ini digunakan untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan terhadap kadar kolesterol total, dilanjutkan dengan *post-Hoc test.* Kadar kolesterol total serum dikatakan bermakna apabila nilai signifikansi yang dihasilkan kurang dari 0,05 ($p<0,05$) dan tidak memiliki perbedaan yang bermakna jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p>0,05$) dengan tingkat kepercayaan 95%.

BAB IV
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak serbuk jintan hitam (*Nigella sativa L.)* sebagai upaya preventif hiperlipidemia yang diujikan pada mencit jantan yang diinduksi dengan *poloxamer.* Parameter yang dilihat dan dibandingkan adalah kadar kolesterol dan trigliserida darah mencit. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk biji jintan hitam yang diperoleh dari Ihya Rumah Herbal Yogyakarta yang berasal dari Yaman.

Penelitian ini dibagi menjadi tiga bagian, yaitu proses ekstraksi bahan alam beserta standarisasinya, penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengoptimasi dosis dan metode yang akan digunakan dan kemudian akan dilanjutkan dengan penelitian inti yang masing-masing dilakukan selama 2 minggu. Pengujian ini dilakukan pada hewan uji berupa mencit jantan galur *balb/c*. Hewan uji yang digunakan mempunyai berat badan sekitar 22-35 gram yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT-UGM). Penelitian ini telah mendapatkan *ethical clearance* dengan nomor KE/FK/401/EC yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (lampiran 1).

A. Hasil Ekstraksi Jintan Hitam

Serbuk jintan hitam mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder, sehingga diperlukan suatu proses ekstraksi untuk menyari senyawa-senyawa metabolis sekunder tersebut. Pada penelitian ini metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Alasan pemilihan metode ini karena maserasi memiliki beberapa keuntungan yaitu peralatan yang dibutuhkan sederhana dan tidak membutuhkan banyak biaya, dapat mudah, dan dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung.

Pelarut yang digunakan untuk pengekstraksian jintan hitam adalah etanol. Pemilihan etanol sebagai pelarut karena etanol merupakan pelarut yang aman, mudah saat penguapan, merupakan pelarut yang netral, absorbsinya baik dan

dapat bercampur dengan air dengan berbagai perbandingan. Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol dengan konsentrasi 80%, hal ini bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa nonpolar dan senyawa polar yang terkandung dalam jintan hitam, yang dicurigai memiliki efek memiliki aktivitas sebagai penurun kadar lipid darah.

Hasil ekstraksi dari 1 kg serbuk biji jintan hitam didapatkan ekstrak yang berwarna *brown*[54] disesuaikan dengan *colour chart* (lampiran 4), ekstrak dapat dilihat pada gambar 7. Rendemen yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah 40,75%. Rendemen adalah prosentase bagian bahan baku yang dapat digunakan atau dimanfaatkan dengan total bahan baku. Rendemen yang semakin besar menandakan bahwa bahan baku tersebut memiliki peluang untuk dimanfaatkan lebih besar dibandingkan bahan baku yang memiliki nilai rendemen rendah atau kecil [53]. Dan jika ekstrak memiliki rendemen yang kecil maka harus dicari metode ekstraksi lain, agar didapat rendemen yang lebih besar.

B. Hasil Standarisasi Ekstrak Jintan Hitam

Standarisasi merupakan parameter prosedur dari cara pengukuran yang hasilnya merupakan mutu dalam artian memenuhi syarat standar (kimia, biologi, farmasi), termasuk jaminan (batas-batas) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya[26].

Hasil standarisasi ekstrak jintan hitam adalah sebagai berikut :

Tabel III. Data hasil standarisasi ekstrak jintan hitam

Parameter standarisasi	Hasil
Organoleptis	Warna ekstrak : *brown*[54] Bau: khas Rasa : pahit Konsistensi : cair
Bobot jenis	0,930 g/ml ± 0,002
Kandungan senyawa aktif	Pengujian kualitatif: Alkaloid (+)

Dari hasil ekstraksi sampel uji standarisasi pertama yang dilakukan adalah uji organoleptis. Uji ini meliputi bentuk, bau, warna dan rasa, uji ini dilakukan dengan seobjektif mungkin. Dari tabel III dan Gambar 7 dapat diketahui bahwa

ekstrak jintan hitam yang diperoleh dari hasil ekstraksi mempunyai mempunyai bau yang khas dan rasa pahit, yang berwarna *brown*[54] disesuaikan dengan colour chart (lampiran 4*)* dan memiliki konsistensi berupa ekstrak cair. Konsistensi ekstrak cair ini dikarenakan kandungan jintan hitam yang berupa minyak sehingga ekstrak tidak dapat berubah menjadi ekstrak kental.



Gambar 7. Ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.*) berwarna *brown*[54]

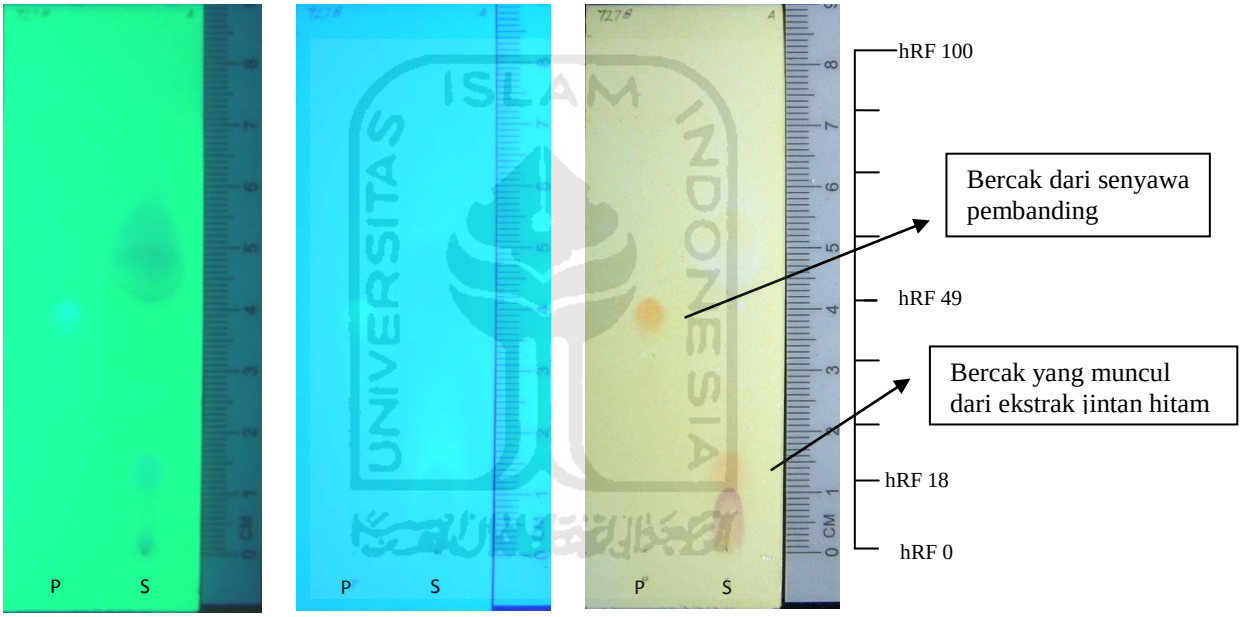
Parameter standarisasi kedua yang diujikan adalah bobot jenis. Uji ini bertujuan untuk memberikan batasan tentang besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang. Pengujian bobot jenis menggunakan alat khusus yaitu piknometer, dengan melakukan replikasi sebanyak 3 kali (lampiran 5 ; tabel IV)

Bobot jenis diperoleh dari perbandingan antara kerapatan ekstrak dengan kerapatan air[26]. Dari data pada tabel IV dapat diketahui bahwa rata-rata bobot jenis pada ekstrak jintan hitam adalah 0,930 g/ml ± 0,002. Hasil penelitian ini sesuai dengan literatur yang menyatakan nilai bobot jenis minyak volatile berkisar antara 0,696 – 1,188 pada suhu 15^0C dan pada umumnya nilai tersebut lebih kecil dari 1,000 [47].

Keuntungan dari penentuan bobot jenis menggunakan piknometer adalah mudah dalam pengerjaan. Namun selain itu penentuan bobot jenis menggunakan piknometer memiliki kekurangan yaitu berkaitan dengan ketelitian dan penimbangan, karena penggunaan dengan piknometer memerlukan waktu yang lama.

Parameter standarisasi yang terakhir diujikan adalah uji kandungan senyawa aktif. Uji kandungan senyawa ekstrak jintan hitam bertujuan untuk mengetahui dan memastikan apakah di dalam ekstrak jintan hitam ini terkandung senyawa alkaloid, yang dicurigai sebagai senyawa yang berperan dalam penurunan kadar lipid darah. Kandungan kimia ekstrak etanol jintan hitam menggunakan metode KLT. KLT ini memiliki prinsip pemisahan berdasarkan "*like-disolve-like*".

Uji senyawa alkaloid ekstrak jintan hitam bersifat kualitatif, yang bertujuan untuk mendeteksi ada tidaknya senyawa alkaloid. Hasil KLT dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 8. Hasil uji kualitatif alkaloid pada ekstrak jintan hitam dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Keterangan :
P = Comparator *quinine*, S = Ekstrak jintan hitam
A = Deteksi sinar UV 254 nm, B = Deteksi sinar UV 365 nm, dan C = Deteksi sinar visibel.
Fase diam = silika gel 60 F_{254}, Fase gerak = metanol : amoniak (100:1,5), Pereaksi : *Dragendorff*

Hasil KLT dari ekstrak jintan hitam akan dibandingkan dengan pembanding atau komparator dan kemudian akan direaksikan dengan pereaksi *Dragendorff* untuk mendeteksi warna. Komparator yang digunakan adalah *quinine.* Digunakan *quinine* sebagai pembanding karena *quinine* merupakan salah satu alkaloid yang umum, sehingga dapat digunakan sebagai pembanding untuk mendeteksi adanya

alkaloid dari suatu ekstrak. *Quinine* akan berwarna biru terang dibawah sinar uv dan akan berwarna coklat jingga berlatar belakang kuning jika di reaksikan dengan pereaksi *Dragendorff* [48].

Dari hasil diperoleh warna spot alkaloid di bawah sinar *visible* berwarna orange dengan Rf alkaloid terdeteksi 0,18 dengan hRF 18. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak positif terdapat senyawa alkaloid. Jenis alkaloid yang terkandung dalam jintan hitam adalah *nigelicine*, *nigellimine* dan *nigellimine N-oxide*, *nigellamine* beserta alkaloid *nigellidine*[18].

C. Optimasi Dosis dan Metode Penelitian

Sebelum melakukan penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengoptimasi dosis dan metode yang akan digunakan dalam penelitian. Optimasi dosis dilakukan untuk mengetahui apakah dosis yang akan digunakan aman dan tidak berefek toksik pada hewan uji. Sedangkan optimasi metode dilakukan untuk melihat lama penelitian dan volume pemejanan yang akan digunakan aman untuk hewan uji.

Optimasi dilakukan selama dua minggu. Mencit yang digunakan berjumlah 15 ekor dan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok normal, kelompok kontrol, kelompok simvastatin, kelompok jintan 750 mg/kgBB, dan kelompok jintan 1500 mg/kgBB.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya (Al-Naqeeb.*et al.*, 2010) yaitu 500 mg/kgBB, dan untuk mendapatkan variasi dosis maka dosis yang digunakan adalah 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Dosis tersebut merupakan dosis kelinci sehingga harus dilakukan konversi dosis ke dosis hewan uji yang digunakan yaitu mencit. Setelah dilakukan konversi dosis maka dosis untuk mencit adalah 15 mg/20 gram (750 mg/kgBB) dan 30 mg/20 gram (1500 mg/kgBB). Dan dosis *poloxamer* yang digunakan adalah 400 mg/kgBB yang diberikan secara intraperitonial.

Selain dilakukan optimasi dosis, dilakukan juga optimasi metode. Pada optimasi metode hal yang perlu diperhatikan adalah lama waktu penelitian dan volume pemejanan ekstrak yang akan diberikan pada hewan uji. Volume pemejanan yang diberikan pada hewan uji disesuaikan dengan berat badan

masing-masing hewan uji, dengan asumsi 0,2 ml untuk mencit dengan berat badan 20 gram. Mencit diberikan perlakuan dengan volume pemejanan yang disesuaikan dengan berat badan selama 2 minggu.

Dari hasil optimasi selama 2 minggu dapat disimpulkan bahwa dosis dan metode yang digunakan aman untuk hewan uji, sehingga dosis dapat digunakan untuk dilanjutkan pada penelitian inti, begitu juga dengan metode yang digunakan.

D. Uji Aktivitas Ekstrak Jintan Hitam Ditinjau dari Parameter Kolesterol dan Trigliderida

Tingginya kadar LDL, trigliserida, dan rendahnya kadar kolesterol HDL merupakan salah satu faktor resiko utama dalam menyebabkan kejadian atherosklerosis. Karena itu diperlukan alternatif dalam mencegah keadaan tersebut. Selain dengan penggunaan obat-obat sintetik dapat pula menggunakan bahan alam sebagai upaya yang digunakan sebagai preventif hiperlipidemia. Salah satu tanaman yang diduga memiliki akivitas yang dapat digunakan sebagai upaya preventif hiperlipidemia adalah jintan hitam. Oleh sebab itu dilakukan penelitian dalam menguji aktivitas dari tanaman ini.

Metode yang digunakan untuk meningkatkan kadar lipid dalam darah adalah dengan memberikan penginduksian poloxamer. Penelitian ini merupakan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui manfaat sebuah tanaman agar dijadikan sebgai terapi preventif atau pencegahan maka penginduksian dilakukan pada akhir masa penelitian, yaitu pada hari ke-14.

Penetapan kadar kolesterol dan trigliserida dilakukan dengan menggunakan serum darah dari mencit. Pengambilan darah dilakukan melalui vena lateral (Gambar 5), karena merupakan pembuluh darah utama sehingga akan dapat dihasilkan volume darah yang banyak.

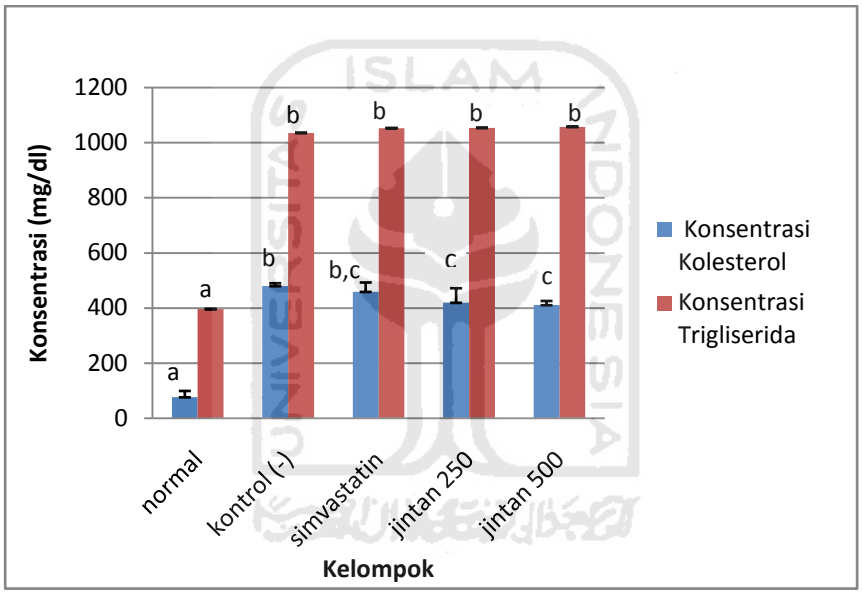
Dalam penelitian ini, terdapat dua parameter yang dilihat untuk mengetahui dan menggambarkan hasil apakah jintan hitam memiliki aktivitas sebagai terapi preventif hiperlipidemia adalah penurunan kadar kolesterol dan trigliserida pada mencit kelompok perlakuan jintan hitam dibandingkan dengan kelompok normal dan kontrol. Jika kadar kolesterol dan trigliserida mencit berada dibawah

kelompok kontrol maka dapat dikatakan bahwa jintan hitam memiliki aktivitas sebagai terapi preventif. Berikut ditampilkan hasil pengujian ekstrak jintan hitam :

Tabel IV. Hasil kadar kolesterol dan trigliserida (mg/dl) pengujian aktivitas jintan hitam sebagai terapi preventif hiperlipidemia

Kelompok	Kadar Kolesterol (mg/dl) ± SD	Kadar Trigliserida (mg/dl) ± SD
Normal	76,68 ± 22,08[a]	395,85 ± 84,66[a]
Kontrol	479,68 ± 9,98[b]	1034,91 ± 5,82[b]
Simvastatin	458,97 ± 33,36[b,c]	1052,26 ± 9,84[b]
Jintan 750 mg/kgBB	419,38 ± 52,15[c]	1053,21 ± 4,11[b]
Jintan 1500 mg/kgBB	410,77 ± 14,47[c]	1056,98 ± 9,21[b]

*Ket: Kelompok dengan *superscript* yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna.



Gambar 9. Grafik rata-rata konsentrasi trigliserida dan kolesterol

Dari Tabel IV diatas dapat dilihat bahwa penginduksian *poloxamer* dapat meningkatkan kadar kolesterol dan trigliserida darah mencit. Dapat dilihat terjadi perbedaaan antara kadar kolesterol pada kelompok normal yang tidak mendapat induksi *poloxamer* dengan kelompok yang mendapatkan penginduksian *poloxamer*. Karena adanya perbedaan metabolisme mencit dengan manusia sehingga menyebabkan kondisi hiperlipidemia pada manusia tidak dapat dijadikan acuan dalam penelitian ini. Sehingga untuk melihat apakah mencit telah mengalami hiperlipidemia maka dapat melihat kadar kolesterol pada kelompok normal yang tidak mendapatkan induksi *poloxamer* dan tidak mendapatkan terapi

dan membandingkannya dengan kelompok kontrol, dimana kelompok ini mendapatkan induksi *poloxamer* dan tidak mendapatkan terapi.

Parameter pertama yang dilihat adalah kolesterol. Sampel darah diambil pada hari ke-15 melalui vena lateral. Kemudian direaksikan dengan reagen kolesterol, reagen ini akan bekerja melalui prinsip pewarnaan secara enzimatis kemudian intensitas warna secara langsung sebanding dengan konsentrasi kolesterol dan bisa ditetapkan secara fotometri[(34)].

Dari data pada Tabel IV diketahui bahwa antar kelompok perlakuan terjadi perbedaan yang signifikan ($p<0.05$). Kelompok normal terlihat memiliki perbedaan yang paling signifikan terhadap semua kelompok perlakuan yang lainnya. Sedangkan bagi kelompok kontrol dan simvastatin tidak ada perbedaan yang signifikan ($p>0.05$), namun terjadi perbedaan kadar yang signifikan antara kelompok jintan 750 mg/kgBB dan jintan 1500 mg/kgBB terhadap kelompok kontrol dan simvastatin. Hal ini berarti menunjukkan kadar kolesterol pada kelompok jintan 750mg/kgBB dan jintan 1500mg/kgBB berbeda, dan jika dilihat dari angkanya berada dibawah kadar kelompok kontrol. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini simvastatin 10 mg/70 kg tidak mampu menurunkan kadar kolesterol, namun pemberian ekstrak jintan hitam 750 mg/kgBB dan jintan 1500 mg/kgBB mampu menurunkan kadar kolesterol pada mencit hiperlipidemia jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Parameter kedua yang diukur adalah trigliserida. Sampel darah diambil pada hari ke-15 melalui vena lateral. Kemudian direaksikan dengan reagen trigliserida, reagen ini akan bekerja melalui prinsip pewarnaan secara enzimatis kemudian intensitas warna secara langsung sebanding dengan konsentrasi trigliserida dan bisa ditetapkan secara fotometri[(34)].

Dari data pada Tabel IV diketahui bahwa antar kelompok perlakuan tidak terjadi perbedaan yang signifikan ($p>0.05$). Hanya kelompok normal yang terlihat memiliki perbedaan yang paling signifikan ($p<0.05$) terhadap semua kelompok perlakuan yang lainnya. Sedangkan bagi kelompok kontrol, simvastatin 10 mg / 70 kg, beserta kelompok jintan 750 mg/kgBB dan jintan 1500 mg/kgBB tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan tidak ada penurunan kadar trigliserida pada kelompok ekstrak setelah diberi perlakuan selama 2

minggu. Dari hasil penelitian ini dapat diketahui pemberian simvastatin 10 mg / 70 kg, ekstrak jintan hitam dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB tidak mampu untuk mencegah peningkatan kadar trigliserida pada mencit hiperlipidemia.

Adanya perbedaan antara kadar kolesterol dan kadar trigliserida ini dimungkinkan karena beberapa faktor yang berpengaruh yang tidak dapat dikendalikan oleh peneliti. Trigliserida merupakan ester dari *trihydric alchohol glicerol* dengan 3 rantai asam lemak. Trigliserida sebagian disintetis di hepar dan sebagian lagi berasal dari asupan makanan[(34)]. Kadar trigliserida dalam darah dapat meningkat akibat pemberian makanan yang mengandung lemak tinggi yang kaya akan asam lemak jenuh. Dalam biji jintan hitam diketahui mengandung asam lemak jenuh[(49)]. Sehingga dalam penelitian ini dimungkinkan pemberian asupan ekstrak jintan hitam selama dua minggu selama terus menerus dapat meningkatkan kadar trigliserida, asam lemak jenuh tersebut dimungkinkan banyak mengalami oksidasi. Dimana asam lemak yang teroksidasi akan membentuk asetil-KoA (β-oksidasi) atau diesterifikasi menjadi asilgliserol, yang menyusun triasigliserol[(34)]. Selain itu peningkatan kadar trigliserida terjadi juga karena penginduksian poloxamer, sehingga pemberian ekstrak jintan hitam dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB belum dapat menurunkan kadar trigliserida.

Selain itu faktor lama waktu pemberian juga di mungkinkan berpengaruh terhadap tidak terjadinya penurunan kadar trigliserida. Pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa lama penuruan kadar trigliserida setelah pemberian jintan hitam berbeda dengan lama penurunan kadar kolesterol. Kadar kolesterol menunjukkan perubahan setelah dua minggu pemberian jintan hitam, sedangkan kadar trigliserida menunjukkan perubahan setelah delapan minggu perlakuan[(32)]. Selain itu pada penelitian lain menyatakan bahwa pemberian jintan hitam selama 12 minggu dapat menunjukkan penurunan yang signifikan terhadap kadar trigliserida[(50)]. Namun pada penelitian ini pemberian jintan hitam hanya berlangsung selama dua minggu karena itulah dimungkinkan kadar trigliserida masih tetap tinggi.

Senyawa yang berperan dalam jintan hitam sebagai antihiperlipidemi adalah *thymoquinone*[(51)] dan alkoloid, seperti *nigellamine*[(42)]. Mekanisme penurunan

kadar lipid dalam darah dari jintan hitam belum banyak diketahui, namun dicurigai penurunan kadar lipid tidak hanya peran dari satu senyawa namun merupakan aksi sinergis dari beberapa senyawa yang berbeda. Senyawa alkaloid dan *thymoquinone* memiliki aktivitas antioksidan potensial yang kuat dengan kemampuan menangkap radikal bebas yang berbeda. Pada penelitian ini mekanisme alkaloid dan *thymoquinone* sebagai penurun kadar kolesterol dimungkinkan bekerja dengan menghambat peroksidase lipid non-enzimatik dalam liposom, dengan demikian maka akan mempengaruhi kadar peroksida lipid[(51)]. Peroksidase lipid non-enzimatik adalah suatu proses kerusakan oksidatif pada senyawa lipid yang terjadi ketika senyawa radikal bebas berekasi dengan senyawa asam lemak tak jenuh majemuk. Jika terjadi penurunan kadar peroksida lipid dalam darah, maka dimungkinkan akan terjadi penurunan kadar kolesterol dan trigliserida dalam darah.

Pada penelitian ini kelompok mencit yang diberikan simvastatin dosis 10 mg/70 kg memiliki kadar trigliserida yang lebih tinggi dari pada kelompok kontrol, pada kadar kolesterol pun kelompok simvastatin memiliki kadar yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini dimungkinkan akibat faktor-faktor yang tidak bisa dikendalikan oleh peneliti. Pada kasus ini dimungkinkan pemberian simvastatin dosis 10 mg/70 kg yang diberikan berulang setiap hari tidak dapat memberikan efek yang diinginkan. Mekasnisme kerja simvastatin adalah menghambat kerja enzim HMG KoA *Reductase* dan memiliki t ½ sekitar 3 hingga 5 jam. Pada penelitian ini pemberian simvastatin satu kali perhari, sehingga simvastatin dimungkinkan akan tereliminasi 4 atau 5 jam setelah pemberian dan tidak memberikan efek fluktuasi pada pemberian simvastatin hari berikutnya. Dan dengan adanya penambahan penginduksian *poloxamer* yang dilakukan pada akhir penelitian ini dimungkinkan pada kasus ini kadar kolesterol dan trigliserida pada kelompok simvastatin 10 mg/70 kg tidak mengalami penurunan setelah pemberian selama dua minggu karena tidak adanya akumulasi dosis simvastatin. Sehingga dapat dikatakan bahwa pada penelitian ini simvastatin tidak optimal untuk digunakan sebagai preventif hiperlipidemia.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.)* dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB mampu menurunkan kadar kolesterol, namun tidak mampu menurunkan kadar trigliserida pada mencit yang diinduksi poloxamer.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan variasi dosis yang berbeda dan durasi penelitian yang lebih lama agar dapat mengetahui aktivitas jintan hitam (*Nigella sativa L.)* sebagai hipotrigliseridemi.
2. Pada penelitian selanjutnya diharapkan melakukan pemastian simplisia jintan hitam (*Nigella sativa L.*) agar mendapatkan hasil penelitian yang lebih optimal.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan obat antihiperlipidemi selain simvastatin.

DAFTAR PUSTAKA

(1) Siti I.O.S, *et al*, 2002, *Daya Hipokolesteromik Karaginan Hasil Ekstrak Rumput Laut Euchema spinosum, Biota, VII(8) : 83-88.*

(2) *Talbert, R. L., 2006, Hiperlipidemia, In Dipiro, Pharmacotherapy Handbook, Mc*Graw Hill Book, New York, 465-495.

(3) Novak, P. D, 1995, *Kamus Saku Kedokteran Dorland*, diterjemahkan oleh Poppy Kumala, et al., Penerbit Buku Kedokteran EKG, Jakarta, 528.

(4) Anonim, 2011, *Hyperlipidemia*, available at http:// www. americanheart.org (diakses tanggal 6 Februari 2011).

(5) Depkes RI, 2010, *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Volume 3* , available at http://www.litbang.depkes.go.id (diakses tanggal 1 Februari 2011).

(6) Liao, J.K., Shin, W.S., Lee, W.Y., and Clark, S.L., 1995, Oxidized low density lipoprotein decreases the expresion of endothelial nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem., 270 : 319-324.*

(7) Lusis, A.J., 2000, Atherosclerosis. *Nature, 407 : 233-241*.

(8) Goodman and Gilman, 2006, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Ed, Mc. Graw Hill Book, New York.

(9) Sacks, F.M., M.A Pfefer and L.A., Moye, 1996, The cholesterol and recurrent events trial investigators : The effect of pravastin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels, N. *Engl. J. Med., 335 : 1001-1009.*

(10) WHO, 2011, *Cardiovascular diseases (CVDs),* available at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html (diakses tanggal 6 Februari 2011).

(11) Stone, N.J., 1996, Lipis management : current diet and drug treatment options, *Am J Med, 101 : 40S-49S.*

(12) Richard S.S, Lacivita, C.L., 2000, *Choosing drug therapy for patients with hyperlipidemia*, available at http://www.aafp.org/afp/20000601/3371.html (diakses tanggal 7 Februari 2011).

(13) Adebayo A.R, A. H., Gatsing D., Garba, I.H., 2007, The effects of ethanolic leaf of commiphora africana (Burseraceae) on rat liver and kidney function, *J. Pharmacol. Toxicol, 2 : 373-329.*

(14) Ruma, K.S, Lusia, O, 2006, Pemanfaatan obat tradisional dengan pertimbangan manfaat dan keamanannya, *Jurnal Farmasi UI.*

(15) El-Dakhani, M, Barakat, M, El-Halim, M, 2000, Effect of N. Sativa oil on gastric secretion and ethanol-induced ulcer in rats, *J. Ethanolpharmacol, 72 : 299-304.*

(16) Daoud, M, Dilsiz, N., Hatice, G., Gulruh, U., Muharrem, B., 2004, *Antitumor Activity of an Ethanol Extract of Nigella sativa Seeds, available at* http://www.biologia.savba.sk/59_6_04/Musa_D.pdf (Di akses tanggal 7 Februari 2011)

(17) Bamosa, A. O., A.A. Basil, A.A. Zubaida, 2002, The effect of thymoqinone on blood lipids in rats, *In. J. Pharmacol., 46 : 195-201.*

(18) Kamal E.H.E, Dana M.B, 2006, The Black Seed Nigella Sativa Linnaeus-A mine for Multi Cures : A Plea for Urgent Clinical Evaluation of its Volatile Oil, *J T U Med Sc,* 1 (1): 1–19.

(19) Anonim, 2011, *Etymology, Characteristic, History, Folk Medicine of Nigella sativa*, available at http://www.en.wikipedia.org/wiki/Nigella_sativa (diakses 12 Februari 2011).
(20) Anonim, 2007, *Nigella Sativa*, available at http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/shaheen_baya/index.htm (diakses tanggal 12 Februari 2011).
(21) Hendrik, 2009, *Habbatus Sauda'*, Pustaka Iltizam, Solo, 88.
(22) Ali. BH, Blunden G, 2003, Pharmacological and Toxicological Properties of Nigella Sativa Linn, *Inflammopharmacol, 7(1): 15-35.*
(23) El-Din K, El-Tahir H, Bakeet D.M, 2006, The black seed (Nigella sativa Linnaeus) a mine for multi cures: A plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil, *JTU. Med. Scl, 1 : 1-19.*
(24) Ramadan, M. F, 2007, Nutrional value, functional properties and nutraceutical application of black cumin (Nigella sativa L*), Pak. J. Bot, 42(10): 1208-1218.*
(25) Abdel-Aal, E.S.M, R.S Attia, 1993, Characterization of black cummin (Nigella sativa) seeds, *Nahrung, 14: 483-496.*
(26) Depkes RI, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan RI , Jakarta, 1-38.
(27) Ansel, H., 1989, *Pengantar Bentuk Sedian Farmasi*, Universitas Indonesia Press, Jakarta, 605-608.
(28) Agoes, G, 2007, *Teknologi Bahan Alam*, Penerbit ITB, Bandung, 35.
(29) Sastrohamidjojo, H., 2002, *Kromatografi*, Edisi kedua, Liberty, Yogyakarta, 1,28-29.
(30) Gandjar, G.I., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 323,353-360.
(31) Skoog DA, West DM, Holler FJ, 1996, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition. New York: Saunders College Publishing, 17-25.
(32) Ghanya A, Ades A, Maznah I, Zulkhairi H.A, Norhaizan M.E, 2010, Antiatherogenic Potential of Nigella sativa Seeds and Oil in Diet-induced Hyperkolesterolemia in Rabbits, *eCAM, 1-9.*
(33) Camelia. S, Anca. S, 2001, Statin : Mecanism of Action and Effect, *J. Cell.Mol.Med*, 5(4) : 378-387.
(34) Pisani T., Gebski C.P., Leary E.T. et al, 1995, Accurate Direct Determination of Low-density LipoproteinCholesterol Using an Immunoseparation Reagent and Enzymatic Cholesterol Assay, *Arch. Pathol Lab Med, 119:1127.*
(35) Anonim, 2011, *Poloxamer 407*, available at http://en.wikipedia.org/wiki/Poloxamer_407 (diakses 22 Februari 2011).
(36) Johnston TP, Palmer WK, 1997, Effect of Poloxamer 407 on the activity of microsomal 3-hydroxy-3 methylglutaryl CoA reductase in rats, *J Cardiovasc Pharmacol*, 29: 580-85.
(37) Johnston TP, Palmer WK, 1993, Mechanism of Poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat, Biochem Pharmacol, *Biochem Pharmacol*, 46: 1037-42.
(38) Johnston TP, Baker JC, Jamal AS, et al, 1999, Potential downregulation of HMG-CoA reductase after prolonged administration of P-407 in C57B/6 mice, *J Cardiovasc Pharmacol, 34: 831-42.*

(39) Johnston TP, Baker JC, Hall DD et al, 2000, Regression of Poloxamer-407-induced atherosclerotic lesions in C57BL/6 mice using atorvastatin, *Atherosclerosis, 149: 303-13.*
(40) Johnston TP, Nguyen LB, Chu WA, et al, 2001, Potency of select statin drugs in a new mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis, *Int J Pharm, 229: 75-86.*
(41) Blonder JM, Baird L, Fulfs JC et al, 1999, Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel, *Life Sci, 65: 261-66.*
(42) Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M, 2004, Nigelamines A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids with metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin, *Chem. Pharm. Bull, 52(4): 494-7.*
(43) Sundaru, H., 2006, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, edisi III, Gaya baru, Jakarta, 1948-1950.
(44) Anonim, 2009, *Atherosclerosis*, available at http://www.nhlbi.nih.gov (diakses 21 Maret 2011).
(45) Anonim, 2000, *Anti-Hyperlipidemic Agent*, available at http://www.people.vcu.edu (diakses 21 Maret 2011).
(46) Leon, C., Wasan, K.M., Sachs-Barrable, K., Johnston, T.P., 2006. Acute P-407 administation to mice causes hypercholesterolemia by inhibiting cholesterogenesis and down-regulating low-density lipoprotein receptor expressions. *Pharmaceutical Research.* 23 (7):1597-1607.
(47) Pujimulyani, D., Wazyka, A., 2009, Sifat Antioksidasi, Sifat Kimia dan Sifat Fisik Manisan Basah dari Kunir Putih (Curcuma mangga Val), *Agritech* : 167 – 173.
(48) Harborne, JB, 1987, Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Institut Teknologi Bandung Press, 239-240.
(49) Bachman N, Faraz M, Kotayoun J, Mohammad A, 2003, Chemical compotition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L., *Z. Naturforsch*, 629-631.
(50) Zaoui A, Cherrah Y, Aloui K, Mahhasinno N, Amarouch H, Hassar M, 2002, Effect of N.sativa fixed oil on blood homeostasis in rats, *J ethnopharmachol*, 79 : 23-6.
(51) Subsash P, Sanjeev B, Aamir A, Ramzi M, Fahzlul H, 2008, From here to eternity-the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumind seeds and beyond, *Cancer therapy*, 6 : 495-510.
(52) Atta-ur-Rahman, 1992, Isolation structural and syntetic studies on chemical constitution of medical plants from pakistan, 55 : 676.
(53) Kusumawati R, Tazwir, Wawasto A, 2008, Pengaruh rendemen dalam asam klorida terhadap kualitas gelatin tulang kakap merah (Lutjanus sp.). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 3(1):63
(54) Stevien D., *Cholor chart*, available at http://3oneseven.com (diakses 29 juli 2011).
(55) Robert K, 2003, *Biokimia Harper*, Edisi 25, Penerbit Buku Kedokteran (EGC), Jakarta, 281.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Kelaikan Etik (*ethical clearance)*

KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
KOMISI ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(Ethical Clearance)

Nomor: KE/FK/ 401 /EC

Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, setelah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan bahwa penelitian dengan:

Judul	:	Aktivitas Jintan Hitam *(Nigella sativa L)* Sebagai Terapi Preventif Hiperlipidemia : Uji Praklinik Secara In Vivo Pada Mencit Yang Diinduksi *Poloxamer*
Peneliti utama	:	Nurul Isnaeni
Pembimbing/Penanggung Jawab Medis	:	1. Asih Triastuti, M.Pharm.,Apt 2. Dimas Adhi Pradana, M.Sc.,Apt
Lembaga/tempat penelitian	:	Laboratorium FMIPA Universitas Islam Indonesia

dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan, dengan catatan sewaktu-waktu Komisi dapat melakukan pemantauan.

Yogyakarta, 11 JUL 2011

Prof. dr. Mohammad Hakimi, Sp.OG (K), Ph.D
Ketua

dr.Tri Wibawa.,Ph.D
Sekretaris

Lampiran 2. Gambar Bahan dan alat ekstraksi



Gambar 10. Serbuk Jintan hitam



Gambar 11. Maserasi Jintan Hitam



Gambar 12. Proses Penyaringan dengan corong buchner



Gambar 13. Rotary Evaporator

Lampiran 3. Surat Keterangan Pembelian Hewan Uji Penelitian

UNIVERSITAS GADJAH MADA
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
(LPPT – UGM)
Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan
Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM
Telp. (0274) 7497705, FAX. (0274) 546868, e-mail: lppt_info@mail.ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN
NO : 189/LP3HP/19/V/2011

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	:	Dr. drh. Pudji Astuti, MP.
NIP	:	19601012 198703 2 001
Jabatan	:	Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama	**:**	**Nurul Isnaeni**
NIM	**:**	**07613071**
Instansi	**:**	**Fak. MIPA Jurusan Farmasi UII**

Pada bulan Mei 2011 membeli Mencit putih (*Mus musculus* L.) jantan galur *Balb/c* usia 1½ bulan sejumlah 30 (Tiga puluh) Ekor dari Unit Pra- Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada

Hewan tersebut dalam keadaan masih Fertil dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit.
Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan digunakan sebagai hewan percobaan Penelitian yang dilaksanakan di Fakultas MIPA jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia.

Demikian surat keterangan ini dibuat, semoga dapat dipergunakan sebagaimana mestinya. dan atas kerjasama yang baik diucapkan terima kasih.

Yogyakarta, 20 Mei 2011
Kabid Unit Pra – Klinik,

Dr. drh. Pudji Astuti, M. P.
NIP : 19601012 198703 2 001

Lampiran 4. Color chart



Lampiran 5. Data hasil uji standarisasi ekstrak

Tabel V. Data hasil uji organoleptis ekstrak jintan hitam

Parameter karakteristik	Deskripsi
Warna	*Brown*[54]
Bau	Berbau khas
Rasa	Pahit
Konsistensi	Cair

Tabel IV. Data hasil perhitungan bobot jenis ekstrak jintan hitam

Replikasi	Berat Ekstrak (gram)	Volume Ekstrak (ml)	Kerapatan ρ=m/v	Bobot jenis
I	22,97	24,76	0,927	0,927
II	23,11	24,76	0,933	0,933
III	23,01	24,76	0,929	0,929
Bobot jenis rata-rata				0,930
Standar deviasi				0,002

Lampiran 6. Perhitungan dosis

1. <u>Perhitungan dosis ekstrak jintan hitam</u>

- Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB → Dosis tersebut menurut penelitian sebelumnya dipejankan pada kelinci dengan berat standar kelinci 1500 gram.
- Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah mencit, sehingga perlu dilakukan konversi dosis terlebih dahulu.

a) Dosis 750 mg/kgBB

❖ ***Konversi Dosis***

→ Konversi dosis kelinci (BB= 1500 g)

$$250 \text{ mg/kgBB} = \frac{250 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{375 \text{ mg}}{1500 \text{ g}}$$

→ Konversi dosis manusia ke mencit (BB = 20 g)

$\frac{375 \text{ mg}}{1500 \text{ g}}$ x 0,04 = **15 mg / 20 g** ~ 15mg/0,2 ml ~750 mg/kgBB

❖ ***Perhitungan larutan stok untuk 2 hari***

20 g ~ 0,2 mL

Volume larutan = 0,2 mL x 6 (mencit) x 3 (hari)

= 3 mL

Larutan stok = $\frac{15 \text{ mg}}{0{,}2 \text{ mL}} = \frac{225 \text{ mg}}{3 \text{ mL}} = \frac{750 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = \mathbf{\frac{0{,}75 \text{ g}}{10 \text{ mL}}}$

❖ ***Volume pemejanan***

Volume pemejanan disesuaikan dengan berat badan mencit.

Misal berat mencit 25 g, maka Vp = $\frac{25\ g}{20\ g}$ x 0,2 mL = **0,25 mL**

b) Dosis 1500 mg/kgBB

→ Konversi dosis kelinci (BB= 1500 g)

500 mg/kgBB $= \frac{500\ \text{mg}}{1000\ \text{g}} = \frac{750\ \text{mg}}{1500\ \text{g}}$

→ Konversi dosis manusia ke mencit (BB = 20 g)

$\frac{750\ \text{mg}}{1500\ \text{g}}$ x 0,04 = **30 mg / 20 g** ~ 30 mg/0,2 ml ~ 1500 mg/kgBB

❖ ***Perhitungan larutan stok untuk 2 hari***

20 g ≃ 0,2 mL

Volume larutan = 0,2 mL x 6 (mencit) x 3 (hari)

= 3 mL

Larutan stok = $\frac{30\ \text{mg}}{0{,}2\ \text{mL}} = \frac{450\ \text{mg}}{3\ \text{mL}} = \frac{1500\ \text{mg}}{10\ \text{mL}} = \frac{\mathbf{1{,}5\ g}}{\mathbf{10\ mL}}$

❖ ***Volume pemejanan***

Volume pemejanan disesuaikan dengan berat badan mencit.

Misal berat mencit 25 g, maka Vp = $\frac{25\ g}{20\ g}$ x 0,2 mL = **0,25 mL**

2. <u>Perhitungan Dosis Simvastatin 10 mg/kgBB</u>

❖ ***Konversi Dosis***

→ Konversi dosis manusia ke mencit (BB = 20 g)

10 mg / 70 kgBB x 0,0026 = **0,026 mg /20 g**

❖ Perhitungan larutan stok untuk 2 hari

Volume larutan = 0,2 mL x 6 (mencit) x 3 (hari)

= 3 mL

Larutan stok = $\frac{0{,}026\ \text{mg}}{0{,}2\ \text{mL}} = \frac{0{,}39\ \text{mg}}{3\ \text{mL}} = \frac{1{,}3\ \text{mg}}{10\ \text{mL}}$

Bobot per tablet = 100 mg

Jadi larutan stok = $\frac{1{,}3\ \text{mg}}{10\ \text{mL}}$ x $\frac{100\ \text{mg}}{10\ \text{mg}} = \frac{1300\ \text{mg}}{10\ \text{mL}} = \frac{\mathbf{1{,}3\ g}}{\mathbf{10\ mL}}$

❖ ***Volume pemejanan***

Volume pemejanan disesuaikan dengan berat badan mencit.

Misal berat mencit 25 g, maka Vp = $\frac{25\ g}{20\ g}$ x 0,2 mL = **0,25 mL**

3. <u>Perhitungan Dosis Poloxamer</u>

Dosis penelitian sebelumnya adalah 400 mg/kgBB

$$400 \text{ mg/kgBB} = \frac{400 \text{ mg}}{1000 \text{ g}}$$

$$= \frac{8 \text{ mg}}{20 \text{ g}}$$

$$= \frac{8 \text{ mg}}{0{,}2 \text{ mL}} = \frac{\mathbf{2\ g}}{\mathbf{50\ mL}}$$

Lampiran 7. Data Absorbansi dan Kadar Kolesterol Hewan Uji

Tabel VII. Data absorbansi dan kadar kolesterol hewan uji

Kelompok	Nomor sampel	Abs. Chol	Abs. Standar	Konsentrasi standar	Kadar Chol (mg/dl)	Rata-rata
Normal	1	0,157	0,313	200	100,32	76,68
	2	0,123	0,313	200	78,59	
	4	0,150	0,313	200	95,85	
	5	0,080	0,313	200	51,12	SD
	6	0,090	0,313	200	57,51	22,08
Kontrol	1	0,764	0,313	200	487,88	Rata-rata
	2	0,741	0,313	200	473,48	479,68
	4	0,771	0,313	200	492,65	
	5	0,735	0,313	200	469,65	SD
	6	0,743	0,313	200	474,76	9,98
Simvastatin	1	0,773	0,313	200	493,93	Rata-rata
	2	0,748	0,313	200	477,96	458,97
	3	0,651	0,313	200	415,97	
	4	0,744	0,313	200	475,40	SD
	5	0,675	0,313	200	431,59	33,36
Jintan 750	1	0,738	0,313	200	471,53	Rata-rata
	3	0,727	0,313	200	464,54	419,38
	4	0,567	0,313	200	362,30	
	5	0,575	0,313	200	367,23	SD
	6	0,675	0,313	200	431,31	52,15
Jintan 1500	1	0,644	0,313	200	411,50	Rata-rata
	3	0,624	0,313	200	398,90	410,77
	4	0,664	0,313	200	424,28	
	5	0,616	0,313	200	393,61	SD
	6	0,666	0,313	200	425,56	14,47

Lampiran 8. Analisis Statistik Kadar Kolesterol Hewan Uji

Uji Normalitas

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
	Kelompok	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar	Normal	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Kontrol	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Simvastatin	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Jintan750	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Jintan1500	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar	Normal	.207	5	.200*	.902	5	.423
	Kontrol	.289	5	.200	.883	5	.323
	Simvastatin	.289	5	.200*	.892	5	.366
	Jintan750	.241	5	.200*	.849	5	.190
	Jintan1500	.225	5	.200*	.894	5	.379

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Oneway

Descriptives

Kadar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Normal	5	76.6780	22.08387	9.87621	49.2573	104.0987	51.12	100.32
Kontrol	5	4.7968E2	9.98384	4.46491	467.2874	492.0806	469.65	492.65
Simvastatin	5	4.5897E2	33.35952	14.91883	417.5487	500.3913	415.97	493.93
Jintan750	5	4.1938E2	52.15151	23.32287	354.6273	484.1367	362.30	471.53
Jintan1500	5	4.1077E2	14.46686	6.46977	392.8070	428.7330	393.61	425.56
Total	25	3.6910E2	153.96440	30.79288	305.5434	432.6502	51.12	493.93

Test of Homogeneity of Variances

Kadar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.590	4	20	.000

ANOVA

Kadar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	550403.662	4	137600.916	148.619	.000
Within Groups	18517.210	20	925.860		
Total	568920.872	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Kadar

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Kontrol	-403.00600*	19.24433	.000	-460.5922	-345.4198
	Simvastatin	-382.29200*	19.24433	.000	-439.8782	-324.7058
	Jintan750	-342.70400*	19.24433	.000	-400.2902	-285.1178
	Jintan1500	-334.09200*	19.24433	.000	-391.6782	-276.5058
Kontrol	Normal	403.00600*	19.24433	.000	345.4198	460.5922
	Simvastatin	20.71400	19.24433	.816	-36.8722	78.3002
	Jintan750	60.30200*	19.24433	.037	2.7158	117.8882
	Jintan1500	68.91400*	19.24433	.014	11.3278	126.5002
Simvastatin	Normal	382.29200*	19.24433	.000	324.7058	439.8782
	Kontrol	-20.71400	19.24433	.816	-78.3002	36.8722
	Jintan750	39.58800	19.24433	.276	-17.9982	97.1742
	Jintan1500	48.20000	19.24433	.129	-9.3862	105.7862
Jintan750	Normal	342.70400*	19.24433	.000	285.1178	400.2902
	Kontrol	-60.30200*	19.24433	.037	-117.8882	-2.7158
	Simvastatin	-39.58800	19.24433	.276	-97.1742	17.9982
	Jintan1500	8.61200	19.24433	.991	-48.9742	66.1982
Jintan1500	Normal	334.09200*	19.24433	.000	276.5058	391.6782
	Kontrol	-68.91400*	19.24433	.014	-126.5002	-11.3278
	Simvastatin	-48.20000	19.24433	.129	-105.7862	9.3862
	Jintan750	-8.61200	19.24433	.991	-66.1982	48.9742

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar

Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Normal	5	76.6780		
Jintan1500	5		4.1077E2	
Jintan750	5		4.1938E2	
Simvastatin	5		4.5897E2	4.5897E2
Kontrol	5			4.7968E2
Sig.		1.000	.129	.816

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 9. Data Absorbansi dan Kadar Trigliserida Hewan Uji

Tabel VII. Data absorbansi dan kadar trigliserida hewan uji

Kelompok	No sampel	Abs. TG	Absorbansi standar	Konsentrasi standar	Kadar TG (mg/dl)	Rata-rata
Normal	1	0,309	0,212	200	291,51	395,85
	2	0,451	0,212	200	425,47	
	3	0,494	0,212	200	466,04	
	4	0,340	0,212	200	320,75	SD
	6	0,504	0,212	200	475,47	84,66
Kontrol	1	1,097	0,212	200	1034,91	Rata-rata
	2	1,105	0,212	200	1042,45	1034,91
	3	1,091	0,212	200	1029,25	
	4	1,101	0,212	200	1038,68	SD
	5	1,091	0,212	200	1029,25	5,82
Simvastatin	1	1,100	0,212	200	1037,74	Rata-rata
	2	1,112	0,212	200	1049,06	1052,26
	3	1,115	0,212	200	1051,89	
	4	1,126	0,212	200	1062,26	SD
	5	1,124	0,212	200	1060,38	9,84
Jintan 750	1	1,115	0,212	200	1051,43	Rata-rata
	2	1,120	0,212	200	1056,15	1053,21
	4	1,111	0,212	200	1048,11	
	5	1,115	0,212	200	1051,89	SD
	6	1,122	0,212	200	1058,49	4,11
Jintan 1500	1	1,116	0,212	200	1052,83	Rata-rata
	3	1,119	0,212	200	1055,66	1056,98
	4	1,125	0,212	200	1061,32	
	5	1,134	0,212	200	1069,81	SD
	6	1,108	0,212	200	1045,28	9,21

Lampiran 10. Analisis Statistik Kadar Trigliserida Hewan Uji

Uji Normalitas

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
	Kelompok	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar	Normal	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Kontrol	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Simvastatin	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Jintan750	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Jintan1500	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar	Normal	.237	5	.200*	.863	5	.241
	Kontrol	.235	5	.200*	.904	5	.431
	Simvastatin	.195	5	.200*	.936	5	.636
	Jintan750	.230	5	.200*	.955	5	.776
	Jintan1500	.158	5	.200*	.993	5	.988

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Oneway

Descriptives

Kadar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Normal	5	3.9585E2	84.66134	37.86170	290.7271	500.9689	291.51	475.47
Kontrol	5	1.0349E3	5.80758	2.59723	1027.6489	1042.0711	1029.20	1042.40
Simvastatin	5	1.0522E3	9.82675	4.39466	1039.9985	1064.4015	1037.70	1062.20
Jintan750	5	1.0532E3	4.08203	1.82554	1048.0915	1058.2285	1048.10	1058.40
Jintan1500	5	1.0569E3	9.23515	4.13008	1045.4730	1068.4070	1045.20	1069.80
Total	25	9.1860E2	269.18054	53.83611	807.4893	1029.7139	291.51	1069.80

Test of Homogeneity of Variances

Kadar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
27.673	4	20	.000

ANOVA

Kadar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1709396.751	4	427349.188	288.758	.000
Within Groups	29599.146	20	1479.957		
Total	1738995.898	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Kadar

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Kontrol	-639.01200*	24.33070	.000	-711.8186	-566.2054
	Simvastatin	-656.35200*	24.33070	.000	-729.1586	-583.5454
	Jintan750	-657.31200*	24.33070	.000	-730.1186	-584.5054
	Jintan1500	-661.09200*	24.33070	.000	-733.8986	-588.2854
Kontrol	Normal	639.01200*	24.33070	.000	566.2054	711.8186
	Simvastatin	-17.34000	24.33070	.951	-90.1466	55.4666
	Jintan750	-18.30000	24.33070	.941	-91.1066	54.5066
	Jintan1500	-22.08000	24.33070	.891	-94.8866	50.7266
Simvastatin	Normal	656.35200*	24.33070	.000	583.5454	729.1586
	Kontrol	17.34000	24.33070	.951	-55.4666	90.1466
	Jintan750	-.96000	24.33070	1.000	-73.7666	71.8466
	Jintan1500	-4.74000	24.33070	1.000	-77.5466	68.0666
Jintan750	Normal	657.31200*	24.33070	.000	584.5054	730.1186
	Kontrol	18.30000	24.33070	.941	-54.5066	91.1066
	Simvastatin	.96000	24.33070	1.000	-71.8466	73.7666
	Jintan1500	-3.78000	24.33070	1.000	-76.5866	69.0266
Jintan1500	Normal	661.09200*	24.33070	.000	588.2854	733.8986
	Kontrol	22.08000	24.33070	.891	-50.7266	94.8866
	Simvastatin	4.74000	24.33070	1.000	-68.0666	77.5466
	Jintan750	3.78000	24.33070	1.000	-69.0266	76.5866

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar

Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Normal	5	395.8480	
Kontrol	5		1.0349E3
Simvastatin	5		1.0522E3
Jintan750	5		1.0532E3
Jintan1500	5		1.0569E3
Sig.		1.000	.891

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 11. Proses pembedahan mencit dan pengujian serum hewan uji



Gambar 14. Proses ethanasi



Gambar 15. Pembedahan mencit

Lampiran 12. Surat Keterangan Reagen Kolesterol

Fluitest® CHOL

CE

CHOLESTEROL CHOD-PAP

Intended use:
Enzymatic in vitro test for the quantitative determination of cholesterol in human serum and plasma.

Summary:
Cholesterol is a steroid with a secondary hydroxyl group in the C_3 position. It is synthesized in many types of tissue, but particularly in the liver and intestinal wall. Approximately three quarters of cholesterol is newly synthesized and a quarter originates from dietary intake.
Cholesterol assays are used for screening for atherosclerotic risk and in the diagnosis and treatment of disorders involving elevated cholesterol levels as well as lipid and lipoprotein metabolic disorders.
Cholesterol analysis was first reported by Liebermann in 1885 followed by Burchard in 1889. In the Liebermann-Burchard reaction, cholesterol forms a blue-green dye from polymeric unsaturated carbohydrates in an acetic acid/acetic anhydride/concentrated sulfuric acid medium. The Abell and Kendall method is specific for cholesterol, but is technically complex and requires the use of corrosive reagents. In 1974, Roeschlau and Allain described the first fully enzymatic method.
This method is based on the determination of Δ^4 cholestenone after enzymatic cleavage of the cholesterol ester by cholesterol esterase conversion of cholesterol be cholesterol oxidase, and subsequent measurement by the Trinder reaction of the hydrogen peroxide formed. Optimization of ester cleavage (>99.5%) allows standardization using primary and secondary standards and a direct comparison with the CDC and NIST reference methods. The Biocon® cholesterol assay meets the 1992 National Institutes of Health (NIH) goal of less than or equal to 3% for both precision and bias.

Test principle:
Enzymatic colorimetric test.
Sample, addition of R1 (cholesterol reagent) and start of reaction; Cholesterol is determined enzymatically using cholesterol esterase and cholesterol oxidase.

$$\text{Cholesterin ester} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholesterol esterase}} \text{Cholesterol} + \text{fatty acids}$$

Cholesterol esters are ceaved by the action or choesterol esterase to yield free choesterol and fatty acids

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholesterol oxidase}} \text{Cholesten-3-on} + H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 + \text{Phenol} + 4\text{-Aminoantipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{quinoeimine dye} + 4\ H_2O$$

Cholesterol is converted by oxygen with the aid of cholesterol oxidase to cholest-4-en 3-one and hydrogen peroxide.
Hydrogen peroxide created forms a red dyestuff by reacting with 4-aminoantipyrine and phenol under the catalytic action of peroxidase. The color intensity is directly proportional to the concentration of cholesterol and can be determined photometrically.

Reagent concentration:

R1:

Pipes buffer, pH 6.9	90 mmol/l
Phenol	26 mmol/l
Cholesterol oxidase	200 U/l
Cholesterol esterase	300 U/l
Peroxidase	1250 U/l
4-Aminoantipyrine	0.4 mmol/l

R4:
(Art.# 4248, #4245, #4241, #4242)
Cholesterol 200 mg/dl (5.17mmol/l)

Preparation and stability:
Reagent and standard are ready for use.
The unopened reagents are stable:
up to expiry date at +2°C to +8°C.
Onboard stability: R1 28 days(Hitachi)
Opened, the reagents are stable:
4 weeks at + 20°C to + 25°C
12 weeks at + 2°C to + 8°C

Specimen
Collect serum using standard sampling tubes.
Heparinized or EDTA plasma. Do not use citrate, oxalate or fluoride-plasma.
Stability: 5-7 days at +2°C to +8°C
3 months at -20°C
Fasting and nonfasting samples can be used.

Centrifuge samples containing precipitate before performing assay.

Notes:
For in vitro diagnostic use.
Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Limitations - Interference:
Criterion: Recovery within ±10% of initial value.
Icterus: No significant interference up to an index I of 8 Bilirubin. (approximate concentration: 8 mg/dl bilirubin)
Hemolysis: No significant interference up to an index H of 450 (approximate hemoglobin concentration: 450 mg/dl).

Testing procedure:
Materials provided
• Working solutions as described above
Additional materials required
• Calibrators and controls as indicated below
• 0.9% NaCl

Manual procedure :

Wavelength:	Hg 546 nm (500-550nm)
Temperature:	+25/+30/+37°C
Cuvette:	1 cm light path
Zero adjustment:	one reagent blank per series only

	Blank	Sample/Calib./Stand.
Sample Calib./Stand.	---	10 µl
R1	1000 µl	1000 µl

Mix. Incubate 5 min. at +37°C or 10 min. at +20°C to +25°C.
Within 60 minutes read absorbance of calibrator and sample against reagent blank.

Calculation:
$\frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Calib./Stand.}}$ x Calib./Stand. conc. = Cholesterol conc.

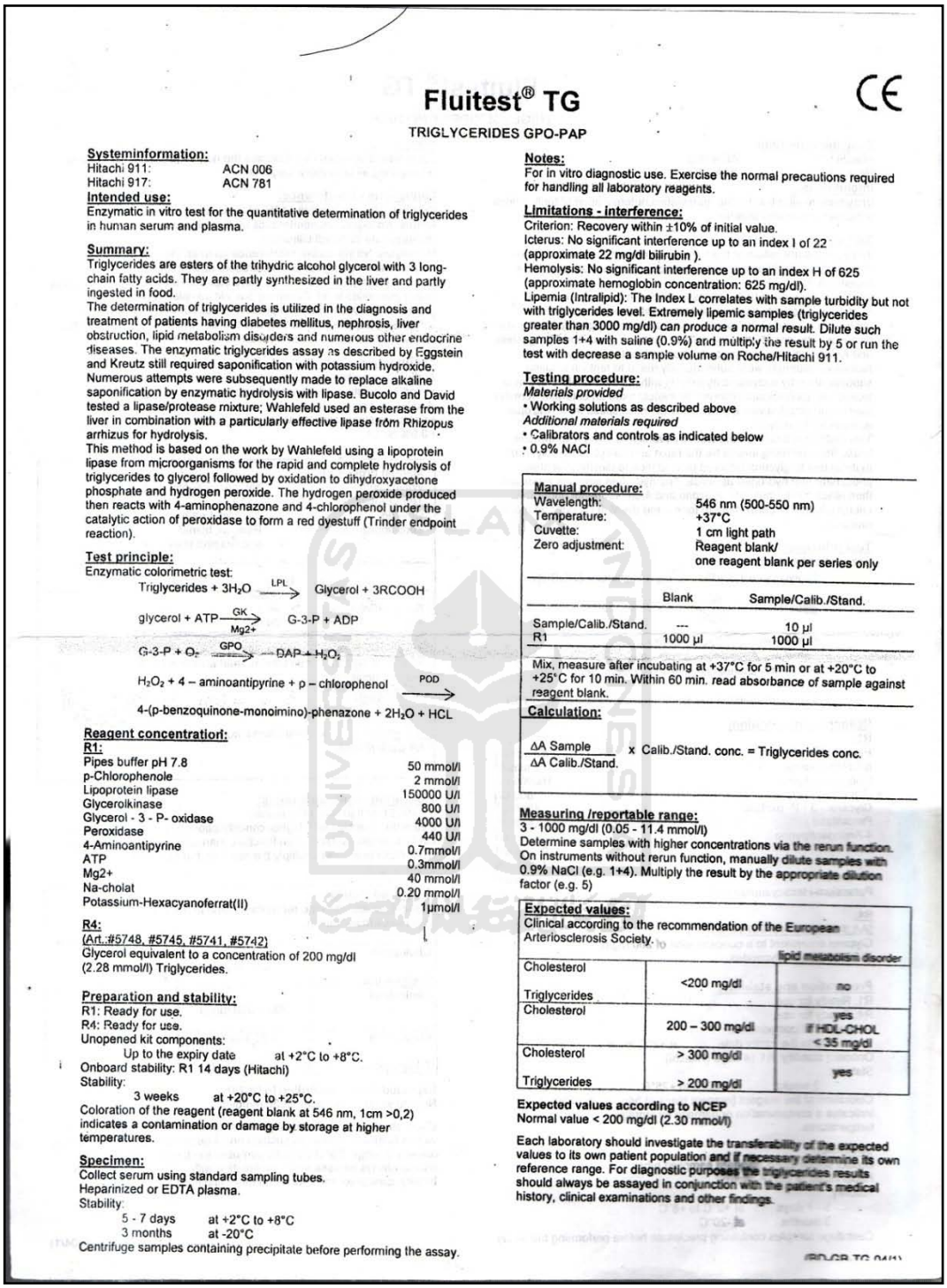
Measuring/reportable range:
3-800 mg/dl (0.08-20.7 mmol/l)
Determine samples having higher activities via the rerun function. On instruments without rerun function, manually dilute the samples with 0.9% NaCl-solution or distilled/deionized water (e.g. 1 + 2). Multiply the result by the appropriate dilution factor (e.g. factor 3).

Expected values:
Clinical interpretation according to the recommendations of the European atherosclerosis Society.

		Lipid metabolic disturbance
Cholesterol Triglycerides	below 200 mg/dl	No
Cholesterol	200 – 300 mg/dl	yes if HDL-Cholesterol below 35 mg/dl
Cholesterol Triglycerides	above 300 mg/dl	Yes

(BD-GB-CHOL-04/1)

Lampiran 13. Surat Keterangan Reagen Trigliserida



Fluitest® TG

CE

TRIGLYCERIDES GPO-PAP

Systeminformation:
Hitachi 911: ACN 006
Hitachi 917: ACN 781

Intended use:
Enzymatic in vitro test for the quantitative determination of triglycerides in human serum and plasma.

Summary:
Triglycerides are esters of the trihydric alcohol glycerol with 3 long-chain fatty acids. They are partly synthesized in the liver and partly ingested in food.
The determination of triglycerides is utilized in the diagnosis and treatment of patients having diabetes mellitus, nephrosis, liver obstruction, lipid metabolism disorders and numerous other endocrine diseases. The enzymatic triglycerides assay as described by Eggstein and Kreutz still required saponification with potassium hydroxide. Numerous attempts were subsequently made to replace alkaline saponification by enzymatic hydrolysis with lipase. Bucolo and David tested a lipase/protease mixture; Wahlefeld used an esterase from the liver in combination with a particularly effective lipase from Rhizopus arrhizus for hydrolysis.
This method is based on the work by Wahlefeld using a lipoprotein lipase from microorganisms for the rapid and complete hydrolysis of triglycerides to glycerol followed by oxidation to dihydroxyacetone phosphate and hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide produced then reacts with 4-aminophenazone and 4-chlorophenol under the catalytic action of peroxidase to form a red dyestuff (Trinder endpoint reaction).

Test principle:
Enzymatic colorimetric test:

$$\text{Triglycerides} + 3H_2O \xrightarrow{LPL} \text{Glycerol} + 3\text{RCOOH}$$

$$\text{glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg2+]{GK} \text{G-3-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-3-P} + O_2 \xrightarrow{GPO} \text{DAP} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4 - \text{aminoantipyrine} + p - \text{chlorophenol} \xrightarrow{POD}$$

$$4\text{-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone} + 2H_2O + HCL$$

Reagent concentration:
R1:

Pipes buffer pH 7.8	50 mmol/l
p-Chlorophenole	2 mmol/l
Lipoprotein lipase	150000 U/l
Glycerolkinase	800 U/l
Glycerol - 3 - P- oxidase	4000 U/l
Peroxidase	440 U/l
4-Aminoantipyrine	0.7mmol/l
ATP	0.3mmol/l
Mg2+	40 mmol/l
Na-cholat	0.20 mmol/l
Potassium-Hexacyanoferrat(II)	1µmol/l

R4:
(Art.:#5748, #5745, #5741, #5742)
Glycerol equivalent to a concentration of 200 mg/dl (2.28 mmol/l) Triglycerides.

Preparation and stability:
R1: Ready for use.
R4: Ready for use.
Unopened kit components:
Up to the expiry date at +2°C to +8°C.
Onboard stability: R1 14 days (Hitachi)
Stability:
3 weeks at +20°C to +25°C.
Coloration of the reagent (reagent blank at 546 nm, 1cm >0,2) indicates a contamination or damage by storage at higher temperatures.

Specimen:
Collect serum using standard sampling tubes.
Heparinized or EDTA plasma.
Stability:
5 - 7 days at +2°C to +8°C
3 months at -20°C
Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

Notes:
For in vitro diagnostic use. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Limitations - interference:
Criterion: Recovery within ±10% of initial value.
Icterus: No significant interference up to an index I of 22 (approximate 22 mg/dl bilirubin).
Hemolysis: No significant interference up to an index H of 625 (approximate hemoglobin concentration: 625 mg/dl).
Lipemia (Intralipid): The Index L correlates with sample turbidity but not with triglycerides level. Extremely lipemic samples (triglycerides greater than 3000 mg/dl) can produce a normal result. Dilute such samples 1+4 with saline (0.9%) and multiply the result by 5 or run the test with decrease a sample volume on Roche/Hitachi 911.

Testing procedure:
Materials provided
• Working solutions as described above
Additional materials required
• Calibrators and controls as indicated below
• 0.9% NACl

Manual procedure:

Wavelength:	546 nm (500-550 nm)
Temperature:	+37°C
Cuvette:	1 cm light path
Zero adjustment:	Reagent blank/ one reagent blank per series only

	Blank	Sample/Calib./Stand.
Sample/Calib./Stand.	---	10 µl
R1	1000 µl	1000 µl

Mix, measure after incubating at +37°C for 5 min or at +20°C to +25°C for 10 min. Within 60 min. read absorbance of sample against reagent blank.

Calculation:

$$\frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Calib./Stand.}} \times \text{Calib./Stand. conc.} = \text{Triglycerides conc.}$$

Measuring /reportable range:
3 - 1000 mg/dl (0.05 - 11.4 mmol/l)
Determine samples with higher concentrations via the rerun function. On instruments without rerun function, manually dilute samples with 0.9% NaCl (e.g. 1+4). Multiply the result by the appropriate dilution factor (e.g. 5)

Expected values:
Clinical according to the recommendation of the European Arteriosclerosis Society.

		lipid metabolism disorder
Cholesterol Triglycerides	<200 mg/dl	no
Cholesterol	200 – 300 mg/dl	yes if HDL-CHOL < 35 mg/dl
Cholesterol Triglycerides	> 300 mg/dl > 200 mg/dl	yes

Expected values according to NCEP
Normal value < 200 mg/dl (2.30 mmol/l)

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference range. For diagnostic purposes the triglycerides results should always be assayed in conjunction with the patient's medical history, clinical examinations and other findings.