

**EFEK PROTEKTIF THYMOQUINONE TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)  
GALUR *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI RIFAMPISIN**

**(Skripsi)**

**Oleh :**  
**VICTORIA HAWARIMA**



**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2017**

**EFEK PROTEKTIF THYMOQUINONE TERHADAP GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)  
GALUR Sprague dawley YANG DIINDUKSI RIFAMPISIN**

**Oleh  
VICTORIA HAWARIMA**

**Skripsi**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
**SARJANA KEDOKTERAN**  
pada  
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2017**

## ABSTRACT

### THE PROTECTIVE EFFECT OF THYMOQUINONE TO LIVER HISTOPATHOLOGY OF WHITE RAT (*Rattus norvegicus*) STRAINS *Sprague dawley* INDUCED RIFAMPICIN

By

VICTORIA HAWARIMA

**Background:** The liver is the largest organ in the body, accounting for about 2 percent of total body weight. Damage to the liver can be caused by drugs, one of them is rifampicin. Rifampicin has hepatotoxic effects, toxic effects of rifampicin related oxidative stress and proinflammatory cytokines. The active ingredients of black cumin, namely thymoquinone have hepatoprotective effects through a mechanism as an antioxidant and anti-inflammatory.

**Objective:** To investigate the protective effect of thymoquinone to liver histopathology of rat induced rifampicin and to determine the effect of increasing doses of thymoquinone to protective effects against liver histopathological of rat induced rifampicin.

**Methods:** This study used 25 rats (*Rattus norvegicus*) male *Sprague dawley* were divided into five groups and were treated for 14 days. K1 (negative control which was only given distilled water), K2 (positive control which is only given rifampicin 1 g/kgBW), P1 (treatment 1 by rifampicin 1 g/kgBW and thymoquinone 5 mg/kgBW), P2 (treatment 2 by rifampicin 1 g/kgBW and thymoquinone 10 mg/kgBW), and P3 (treatment 3 by rifampicin 1 g/kgBW and thymoquinone 20 mg/kgBW).

**Results:** The average percentage of cloudy swelling degeneration of hepatocytes are K1: 1,8%, K2: 37,6%, P1: 2%, P2: 1,8%, and P3: 6,64%. In P1, P2, and P3 has decreased when compared with the K2.

**Conclusion:** There is a protective effect thymoquinone at doses of 5, 10, and 20 mg/kgBW and there is a protective effect with increased doses of 5 to 10 mg/kgBW but does not occur at a dose of 20 mg/kgBW.

Keywords: liver, rifampicin, thymoquinone

## ABSTRAK

### EFEK PROTEKTIF THYMOQUINONE TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI RIFAMPISIN

Oleh

VICTORIA HAWARIMA

**Latar Belakang:** Hepar merupakan organ terbesar pada tubuh, menyumbang sekitar 2 persen berat tubuh total. Kerusakan pada hepar dapat disebabkan oleh obat-obatan, salah satunya adalah rifampisin. Rifampisin memiliki efek hepatotoksik, efek toksik rifampisin terkait stres oksidatif dan sitokin proinflamasi. Bahan aktif dari jintan hitam, yaitu *thymoquinone* memiliki efek hepatoprotektif melalui mekanisme sebagai antioksidan dan antiinflamasi.

**Tujuan:** Untuk mengetahui adanya efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus yang diinduksi rifampisin dan untuk mengetahui adanya pengaruh peningkatan dosis *thymoquinone* pada efek protektif terhadap gambaran histopatologi hepar tikus yang diinduksi rifampisin.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang dibagi ke dalam 5 kelompok dan diberi perlakuan selama 14 hari. K1 (kontrol negatif yang hanya diberi akuades), K2 (kontrol positif yang hanya diberi rifampisin 1 g/kgBB), P1 (perlakuan 1 yang diberi rifampisin 1 g/kgBB dan *thymoquinone* 5 mg/kgBB), P2 (perlakuan 2 yang diberi rifampisin 1 g/kgBB dan *thymoquinone* 10 mg/kgBB), dan P3 (perlakuan 3 yang diberi rifampisin 1 g/kgBB dan *thymoquinone* 20 mg/kgBB).

**Hasil:** Hasil rerata persentasi degenerasi bengkak keruh hepatosit adalah K1: 1,8%, K2: 37,6%, P1: 2%, P2: 1,8%, dan P3: 6,64%. Pada P1, P2, dan P3 mengalami penurunan jika dibandingkan dengan K2.

**Simpulan:** Terdapat efek protektif *thymoquinone* pada dosis 5, 10, dan 20 mg/kgBB dan terdapat efek protektif dengan peningkatan dosis dari 5 menjadi 10 mg/kgBB namun tidak terjadi pada dosis 20 mg/kgBB.

Kata kunci: hepar, rifampisin, *thymoquinone*

Judul : **PENGARUH PEMBERIAN THYMOQUINONE TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR Sprague dawley YANG DIINDUKSI RIFAMPISIN**

Nama Mahasiswa : Victoria Hawarima

NPM : 1318011174

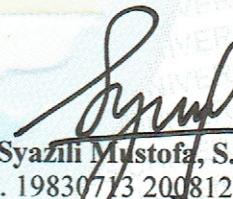
Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran

### MENYETUJUI

#### 1. Komisi Pembimbing

  
dr. Susianti, S.Ked., M.Sc  
NIP. 19780805 200501 2 003

  
dr. Syazili Mustofa, S.Ked., M.Biomed  
NIP. 19830713 200812 1 003

#### 2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M. Kes., Sp. PA  
NIP 19701208 200112 1 001

**MENGESAHKAN**

1. Tim Pengaji

Ketua : dr. Susanti, S.Ked., M.Sc

Sekretaris

: dr. Syazili Mustofa, S.Ked., M.Biomed

Pengaji

Bukan Pembimbing : dr. Khairun Nisa B., S.Ked., M.Kes., AIFO

2. Dekan Fakultas Kedokteran



Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 23 Januari 2017

## **LEMBAR PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul “EFEK PROTEKTIF THYMOQUINONE TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI RIFAMPISIN” adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 30 Januari 2017

Pembuat pernyataan,



**Victoria Hawarima**

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Magelang pada tanggal 20 Januari 1996, merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, dari Ayahanda Bungkus Aryo Prasetyo dan Ibunda Gloriana Dian Dhamajanti.

Pendidikan Taman Kanak-Kanak (TK) diselesaikan di TK Madrasah Insani Bandar Lampung pada tahun 2001, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Taman Siswa Bandar Lampung pada tahun 2003 dan SD Citra Insani Rawajitu Timur pada tahun 2007, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di SMP Negeri 1 Rawajitu Timur pada tahun 2010, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA Al-Azhar 3 Bandar Lampung pada tahun 2013.

Tahun 2013, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah aktif pada organisasi PMPATD Pakis *Rescue Team* sebagai anggota divisi Organisasi pada tahun 2015.

## **SANWACANA**

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini berjudul “EFEK PROTEKTIF *THYMOQUINONE* TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *Sprague dawley* YANG DIINDUKSI RIFAMPISIN” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes, Sp.PA., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
3. dr. Susianti, S.Ked., M.Sc., selaku Pembimbing Satu yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan bimbingan, kritik, saran, dan nasihat yang bermanfaat dalam penelitian skripsi ini;

4. dr. Oktadoni Saputra, S.Ked., M.Med.Ed., selaku Pembimbing Kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan masukan, kritik, saran, dan nasihat bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini;
5. dr. Syazili Mustofa, S.Ked., M.Biomed., selaku Pembimbing Kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan masukan, kritik, saran, dan nasihat bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini;
6. dr. Khairun Nisa B., S.Ked., M.Kes., AIFO., selaku Pembahas skripsi yang bersedia meluangkan waktu dan kesediannya untuk memberikan kritik, saran, dan nasihat yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;
7. dr. Anggraini Janar Wulan, S.Ked., M.Sc., selaku Pembimbing Akademik saya atas waktu dan bimbingannya;
8. Papa tercinta Bungkus Aryo Prasetyo, terima kasih banyak atas doa, kasih sayang, nasihat, dukungan, serta bimbingan yang selalu diberikan untukku. Semoga Allah SWT selalu melindungi dan menyayangi papa;
9. Mama tercinta Gloriana Dian Dhamajanti, terima kasih banyak atas doa, kasih sayang, nasihat, dukungan, serta bimbingan yang selalu diberikan untukku. Semoga Allah SWT selalu melindungi dan menyayangi mama;
10. Saudara kandung saya, Stevia Diandara dan Ferdian Wignyo Santuario, yang selalu memberikan doa, dukungan, semangat, dan kasih sayangnya;
11. Seluruh Staf Dosen FK Unila atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis untuk menambah wawasan yang menjadi landasan untuk mencapai cita-cita;
12. Seluruh Staf Tata Usaha, Administrasi, Akademik, pegawai dan karyawan FK Unila;

13. Tim Penelitian saya, Rika Oktaria. atas kerjasama dan bantuannya dalam melakukan penelitian ini;
14. Teman-teman terdekat saya Saza, Analia, dan Intan yang telah membantu dalam pembelajaran dan juga penelitian;
15. Teman-teman sejawat angkatan 2013 (CERE13ELLUM) yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akan tetapi, semoga skripsi yang sederhana ini dapat bermanfaat dan berguna bagi kita semua.

Bandar Lampung,30 Januari 2017  
Penulis

**Victoria Hawarima**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	i
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	iii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	iv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.4. Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1. Bagi Ilmu Pengetahuan.....	5
1.4.2. Bagi Institusi.....	5
1.4.3. Bagi Peneliti Lain .....	5
1.4.4. Bagi Peneliti .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Hepar .....	6
2.2. Histopatologi Hepar .....	16
2.3. Rifampisin Penyebab Hepatotoksik .....	19
2.4. <i>Thymoquinone</i> .....	25
2.5. <i>Thymoquinone</i> sebagai hepatoprotektif.....	26
2.6. Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Galur <i>Sprague dawley</i> .....	29
2.7. Kerangka Teori.....	31
2.8. Kerangka Konsep .....	35
2.9. Hipotesis.....	35
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b> .....	36
3.1. Desain Penelitian.....	36
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian .....	36
3.3. Populasi dan Sampel .....	36
3.3.1. Populasi Penelitian .....	36
3.3.2. Sampel Penelitian .....	37
3.3.3. Kelompok Perlakuan .....	38
3.3.4. Kriteria Inklusi.....	39
3.3.5. Kriteria Eksklusi .....	40
3.4. Bahan dan Alat Penelitian .....	40
3.4.1. Bahan Penelitian .....	40

3.4.2. Bahan kimia.....	41
3.4.3. Perangkat Penelitian .....	41
3.5. Prosedur Penelitian.....	42
3.6. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel .....	50
3.6.1. Identifikasi Variabel .....	50
3.6.2. Definisi Operasional Variabel .....	50
3.7. Analisis Data .....	51
3.8. <i>Ethical Clearance</i> .....	51
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>52</b>
4.1. Hasil Penelitian .....	52
4.1.1. Gambaran Histopatologi Hepar Tikus .....	52
4.1.2. Analisis Mikroskopis Kerusakan Hepar Tikus .....	56
4.2. Pembahasan.....	59
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>66</b>
5.1. Kesimpulan .....	66
5.2. Saran.....	66
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>67</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>73</b>

**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Data biologis tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) galur <i>Sprague dawley</i> .....	31
2. Definisi operasional variabel.....	50
3. Rerata persentase degenerasi bengkak keruh hepatosit.....	56
4. Hasil perhitungan dengan uji <i>Post Hoc Mann Whitney</i> .....	59

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Letak hepar dan kandung empedu .....	7
2. Permukaan anterior dan posterior hepar.....	8
3. Pandangan anterior arteri dan vena pada hepar.....	9
4. Lobulus hepar.....	10
5. Trias porta (C, D, E).....	11
6. Struktur hepar.....	12
7. Vena sentralis (CV).....	14
8. Degenerasi bengkak keruh.....	18
9. Struktur rifampisin.....	19
10. Struktur <i>thymoquinone</i> .....	25
11. Tikus putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) galur <i>Sprague dawley</i> .....	30
12. Kerangka teori pengaruh pemberian <i>thymoquinone</i> terhadap histopatologi hepar yang diinduksi rifampisin.....	34
13. Kerangka konsep.....	35
14. Diagram alur penelitian.....	49
15. Histopatologi hepar tikus kelompok K1.....	53
16. Histopatologi hepar tikus kelompok K2.....	53
17. Histopatologi hepar tikus kelompok P1.....	54
18. Histopatologi hepar tikus kelompok P2.....	55

19. Histopatologi hepar tikus kelompok P3.....56
20. Grafik perbandingan hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh...57

## **BAB 1** **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Hepar merupakan organ terbesar pada tubuh, menyumbang sekitar 2 persen berat tubuh total, atau sekitar 1,5 kg pada rata-rata manusia dewasa. Selain sebagai organ terbesar, hepar juga memiliki peranan penting dalam tubuh antara lain penyaringan dan penyimpanan darah, metabolisme (karbohidrat, protein, lemak, hormon, dan zat kimia asing), pembentukan empedu, penyimpanan vitamin dan besi, dan pembentukan faktor koagulasi (Guyton & Hall, 2012). Sel hepar mempunyai kemampuan regenerasi yang cepat. Oleh karena itu sampai batas tertentu, hepar dapat mempertahankan fungsinya bila terjadi gangguan ringan, namun pada gangguan yang lebih berat akan terjadi gangguan fungsi yang serius dan akan berakibat fatal (Dirjen Binfar & Alkes, 2007).

Penyebab penyakit hepar bervariasi, antara lain virus, efek toksik dari obat-obatan, alkohol, racun, jamur, dan lain-lain. Angka pasti prevalensi dan insidens penyakit hepar di Indonesia belum diketahui, tetapi data WHO menunjukkan bahwa Indonesia termasuk dalam peringkat endemik yang

tinggi untuk penyakit hepar yang disebabkan oleh virus (Dirjen Binfar & Alkes, 2007).

Meskipun di Indonesia merupakan endemik tinggi untuk penyakit hepar akibat virus, namun kerusakan hepar karena obat dapat menjadi masalah kesehatan yang berkembang. Di seluruh dunia, diperkirakan tingkat kejadian tahunan dari *drug-induced liver injury* (DILI) adalah 13,9-24,0 per 100.000 penduduk. Antimikroba merupakan salah satu penyebab paling umum dari DILI (Suk & Kim, 2012). Selain itu, dalam dua survei dari Eropa menunjukkan bahwa angka kematian yang disebabkan oleh obat penginduksi kerusakan hepar dilaporkan sebesar 5,9% dan 11,9%, masing-masing disebabkan oleh antibiotik, obat-obatan penurun lipid (antihiperlipidemia), antidepressan, dan analgesik (Wai, 2006).

Obat yang dapat menyebabkan kerusakan hepar salah satunya adalah rifampisin. Rifampisin merupakan salah satu obat utama untuk tuberkulosis (TB), oleh karena itu penggunaan obat ini tidak dapat dihindari. Indonesia berada pada ranking kelima negara dengan beban TB tertinggi di dunia (Dirjen P2 & PL, 2011). Prevalensi penduduk Indonesia yang didiagnosis TB paru oleh tenaga kesehatan tahun 2013 adalah 0,4 persen, tidak berbeda dengan tahun 2007. Lima provinsi dengan TB paru tertinggi adalah Jawa Barat (0,7%), Papua (0,6%), DKI Jakarta (0,6%), Gorontalo (0,5%), Banten (0,4%), dan Papua Barat (0,4%) (Balitbang Depkes, 2013).

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa rifampisin memiliki efek hepatotoksik. Dalam sebuah penelitian pada hepatosit tikus, efek toksik rifampisin terkait stres oksidatif dan akumulasi lipid (Mashhadian *et al.*, 2013). Selain itu rifampisin dapat meningkatkan kadar Alanine aminotransferase (ALT) dan Aspartate aminotransferase (AST), laktat dehidrogenase, fosfatase asam, alkalin fosfatase, serta meningkatkan kadar trigliserida, kolesterol, dan asam lemak bebas di dalam serum (Santhosh *et al.*, 2006). Gambaran histopatologi kerusakan hepar akibat rifampisin muncul sebagai nekrosis yang tergantung dosis, degenerasi vakuoler, dan infiltrasi sel radang (Chen & Raymond, 2006).

Kerusakan hepar dapat diperbaiki dengan pemanfaatan obat-obat tradisional. Salah satu tanaman yang digunakan untuk pengobatan tradisional adalah jintan hitam (*Nigella sativa*). Secara tradisional biji dari jintan hitam sering digunakan oleh masyarakat khususnya di Timur Tengah dan beberapa negara Asia (Al-Naqaep *et al.*, 2009; Tasawar *et al.*, 2011). Salah satu kandungan jintan hitam yang mempunyai banyak manfaat adalah *thymoquinone* (Hosseinzadeh *et al.*, 2007).

*Thymoquinone* terbukti memiliki berbagai manfaat yang baik bagi kesehatan sebagai antiinflamasi dan imunomodulator (Sulistri & Radji, 2014), antiparasit (Hapsari, 2011), antibakteri (Hosseinzadeh *et al.*, 2007), antioksidan (Alenzi *et al.*, 2013), serta proteksi terhadap nefrotoksisitas dan hepatotoksisitas (Purnomo, 2008; Shiddiqi, 2008). Menurut penelitian Alsaif, dilaporkan

bahwa kandungan jintan hitam yaitu *thymoquinone*, dapat mencegah kerusakan hepar pada tikus putih yang diinduksi etanol melalui mekanisme sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Alsaif, 2007). Selain itu *thymoquinone* memiliki efek sitoprotektif melalui mekanisme antioksidan (Mousavi *et al.*, 2010). Oleh karena itu, penulis berminat melakukan penelitian tentang efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin.

### **1.2. Rumusan Masalah**

1. Apakah terdapat efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin?
2. Apakah terdapat pengaruh peningkatan dosis pada efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui adanya efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin.
2. Mengetahui adanya pengaruh peningkatan dosis pada efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin.

## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Bagi Ilmu Pengetahuan**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin.

### **1.4.2. Bagi Institusi**

Meningkatkan penelitian dibidang *agromedicine* sehingga dapat menunjang pencapaian visi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (FK Unila) sebagai Fakultas Kedokteran sepuluh terbaik di Indonesia pada tahun 2025 dengan kekhususan *agromedicine*.

### **1.4.3. Bagi Peneliti Lain**

Dapat dijadikan bahan acuan untuk dilakukannya penelitian yang serupa yang berkaitan dengan efek protektif *thymoquinone* terhadap organ lainnya selain hepar.

### **1.4.4. Bagi Peneliti**

Penelitian ini akan memperluas wawasan keilmuan peneliti serta menjadi pengalaman yang bermanfaat dalam pengaplikasian disiplin ilmu yang telah dipelajari selama perkuliahan.

## **BAB 2**

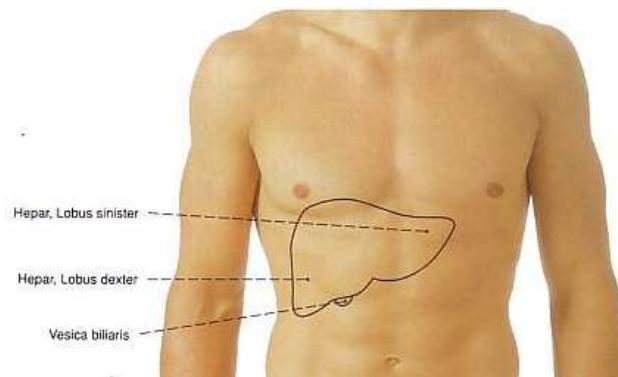
### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Hepar**

Hepar adalah kelenjar paling besar dalam tubuh setelah kulit. Berat hepar kira-kira 1500 g dan mencangkup sekitar 2,5% berat tubuh orang dewasa. Hepar memanjang ke dalam hipokondrium kiri di sebelah inferior diafragma, yang memisahkannya dari pleura, paru, perikardium, dan jantung. Semua zat gizi (kecuali lemak) yang diabsorbsi dari saluran pencernaan pada awalnya dibawa pertama kali ke hepar oleh sistem vena porta. Selain aktivitas metabolismnya banyak, hepar menyimpan glikogen dan juga mensekresikan empedu. Empedu merupakan zat yang berperan penting dalam pencernaan dan absorpsi lemak. Selain itu empedu bekerja sebagai alat untuk mengeluarkan beberapa produk buangan yang penting dari darah, terutama bilirubin dan kelebihan kolesterol (Guyton & Hall, 2012; Moore & Dalley, 2013).

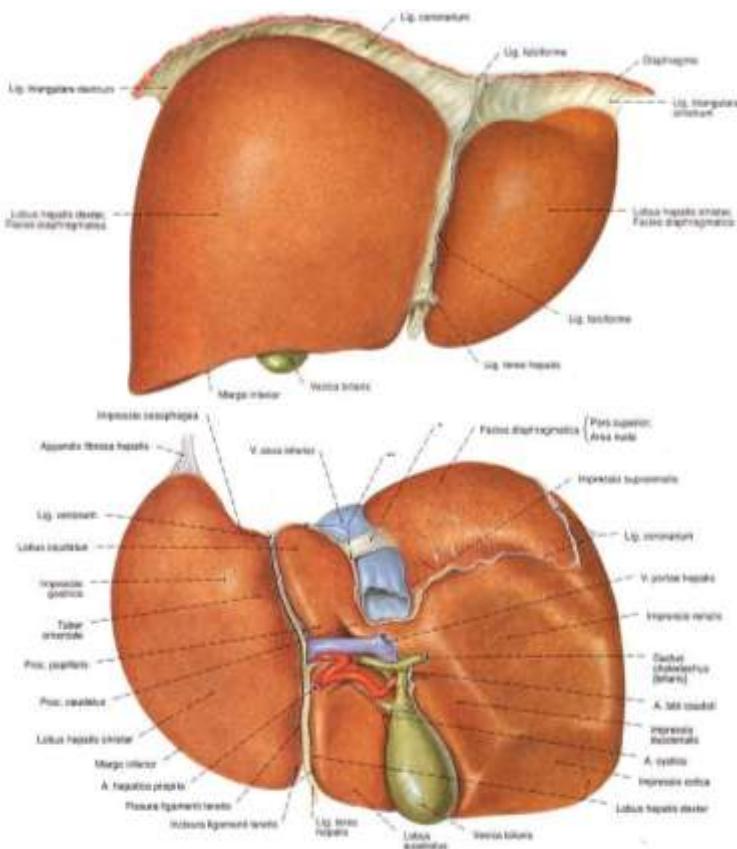
Empedu berjalan dari hepar melalui duktus hepatikus kanan dan kiri yang bergabung untuk membentuk duktus hepatikus komunis, yang menyatu dengan duktus sistikus kemudian membentuk duktus biliaris. Hepar menghasilkan empedu secara kontinu, namun diantara waktu makan empedu

menumpuk dan disimpan dalam vesika biliaris, dimana vesika biliaris juga memekatkan empedu dengan mengabsorbsi air dan garam. Bila makanan tiba dalam duodenum, vesika biliaris mengirimkan empedu yang sudah dipekatkan melalui duktus biliaris ke duodenum (Moore & Dalley, 2013).



**Gambar 1.** Letak hepar dan kandung empedu (Putz & Pabst, 2003)

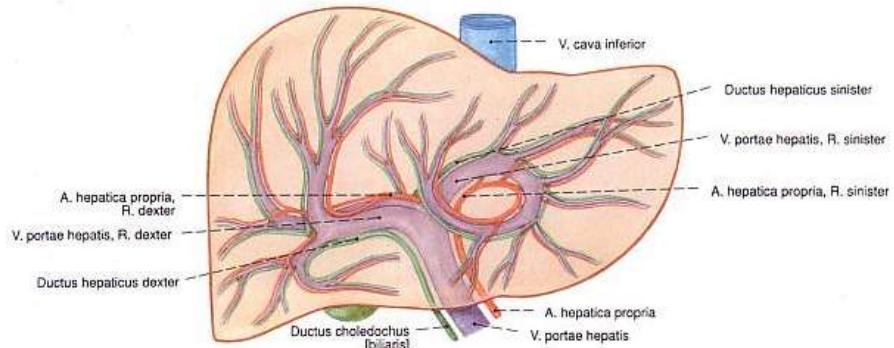
Hepar memiliki suatu permukaan diafragmatik (*facies diaphragmatica*) konveks (anterior, superior, dan beberapa posterior) dan permukaan visceral yang relatif rata atau bahkan konkaf (posteroinferior) yang dipisahkan di anterior oleh batas inferior tajamnya. Permukaan diafragmatik polos, namun permukaan visceral memiliki banyak fissura dan impresi akibat kontak dengan organ-organ lain. Hepar mempunyai empat lobus anatomis yaitu lobus kanan, lobus kiri, lobus quadratus, dan lobus caudatus. Antara setiap lobus dibatasi oleh fissura. *Fissura sagittalis sinistra* (dan *ligamentum falciforme* pada permukaan diafragmatik) membatasi lobus kanan dan kiri. *Fissura sagittalis dextra* dan *sinistra* serta porta hepatis yang menghubungkannya membentuk seperti huruf H pada permukaan visceral, yang membatasi lobus quadratus dan caudatus (Moore & Dalley, 2013).



**Gambar 2.** Permukaan anterior dan posterior hepar  
(Putz & Pabst, 2003)

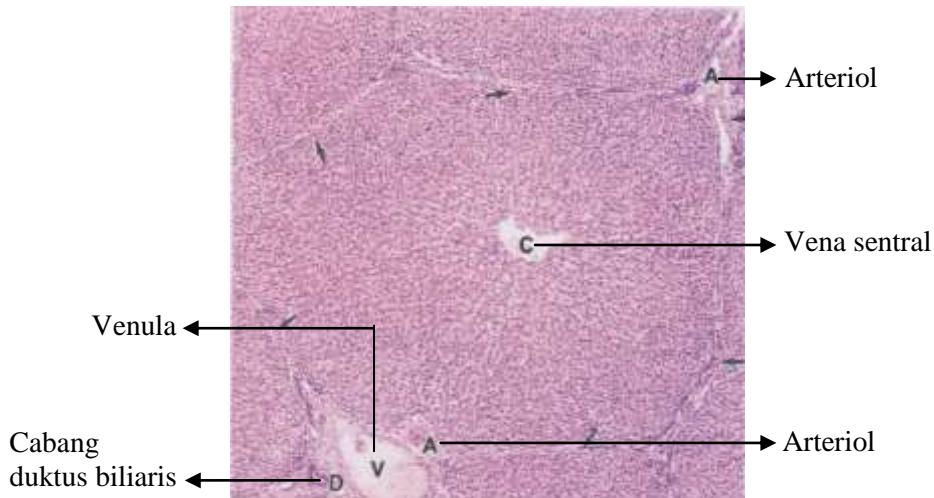
Hepar mempunyai suplai darah ganda (suatu sumber vena dominan dan satu arteri yang lebih sedikit). Vena porta membawa 75-80% darah ke hepar. Vena porta membawa hampir semua zat gizi yang diabsorbsi oleh saluran pencernaan (kecuali lipid) ke sinusoid hepar. Darah arterial dari arteria hepatica, yang hanya mencangkup 20-25% darah yang diterima oleh hepar, pada awalnya didistribusikan ke struktur nonparenkimal, terutama duktus biliaris intrahepatik. Vena porta terbentuk oleh vena lienalis dan mesentika superior di sebelah posterior *collum pancreatic* dan naik di sebelah anterior vena cava inferior sebagai bagian trias porta dalam ligamentum hepatoduodenal. Arteria hepatica, cabang trunkus koeliakus, dapat dibagi

menjadi arteria hepatica communis, dari trunkus koeliakus ke asal arteria gastroduodenal, dan arteria hepatica propria, dari asal arteria gastroduodenalis ke bifurcatio arteria hepatica (Moore & Dalley, 2013).



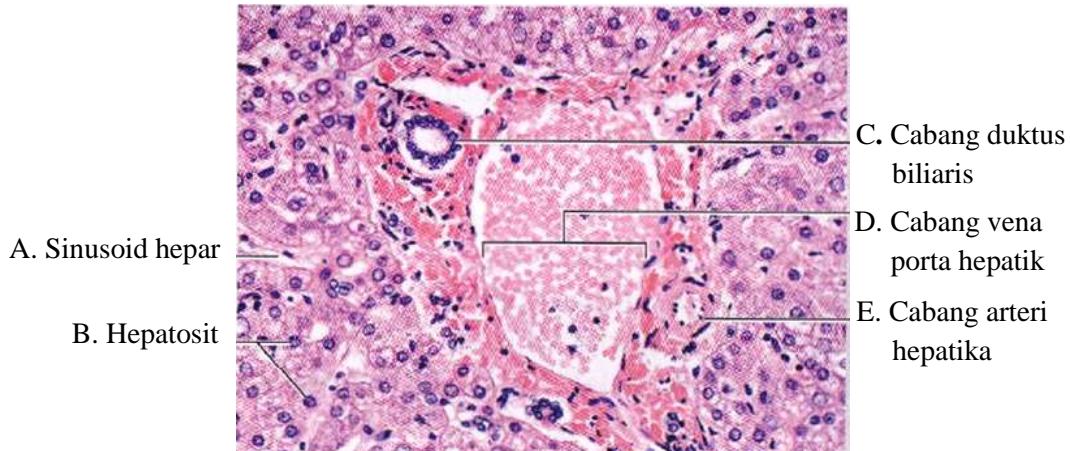
**Gambar 3.** Pandangan anterior arteri dan vena pada hepar  
(Putz & Pabst, 2003)

Hepar dibungkus oleh suatu simpai tipis jaringan ikat yang menebal di hilus, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki organ dan keluarnya duktus hepatica kiri dan kanan serta pembuluh limfe dari hepar. Seperti terlihat pada gambar 4, pembuluh-pembuluh dan duktus ini dikelilingi jaringan ikat di sepanjang perjalanannya ke bagian ujung (bagian asal) di dalam celah portal di antara lobulus hepar. Di tempat ini, jalinan serat retikular halus mengelilingi dan menopang sel hepar dan sel endotel sinusoid di lobulus hepar (Mescher, 2012).



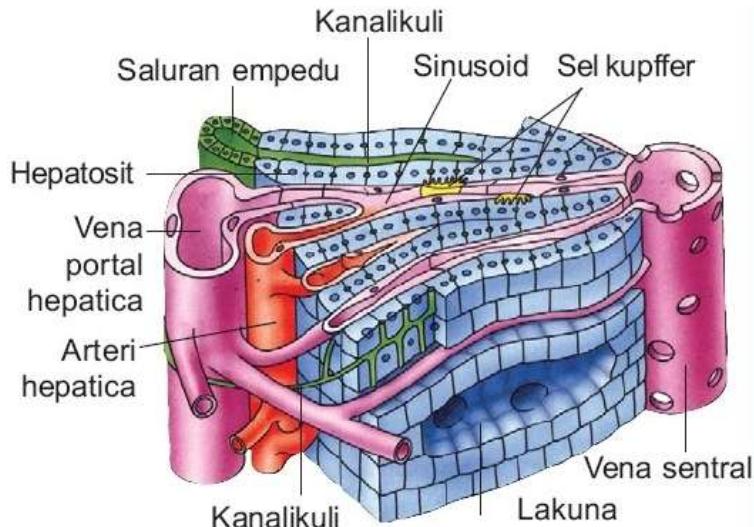
**Gambar 4.** Lobulus hepar (Mescher, 2012)

Sel-sel hepar atau hepatosit merupakan sel epitel yang berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan. Hepatosit tersusun berupa ribuan lobulus hepar kecil ( $0,7 \times 2$  mm) polihedral yang merupakan unit fungsional dan struktural hepar yang klasik. Setiap lobulus memiliki tiga sampai enam area portal di bagian perifernya dan suatu venula yang disebut vena sentral di bagian pusatnya. Zona portal di sudut lobulus terdiri dari jaringan ikat dengan venula (cabang vena portal), arteriol (cabang arteri hepatis), dan duktus epitel kuboid (cabang sistem duktus biliaris). Ketiga struktur tersebut dinamakan trias porta yang dapat dilihat pada gambar 5 (Mescher, 2012).



**Gambar 5.** Trias porta (C,D,E) (Mescher, 2012)

Hepatosit membentuk suatu lempeng yang berhubungan seperti susunan batu bata di tembok dan lempeng sel ini tersusun radial di sekeliling vena sentral. Lempeng hepatosit bercabang dan beranastomosis secara bebas membentuk struktur yang menyerupai spons dari bagian perifer lobulus ke pusatnya. Cela di antara lempeng ini mengandung komponen mikrovaskular penting, yaitu sinusoid hepar. Sinusoid lebar tidak teratur, terpisah dari hepatosit di bawahnya oleh suatu lamina basal tipis yang tidak kontinu dan suatu celah perisinusoid yang sangat sempit. Mikrovili hepatosit menonjol ke dalam celah tersebut demi terjadinya pertukaran antara sel tersebut dan plasma. Pertukaran ini penting secara fisiologis bukan saja karena banyaknya makromolekul (misalnya lipoprotein, albumin, fibrinogen) yang disekresi ke dalam darah oleh hepatosit, tetapi juga karena hepar mengambil dan mengabolisme sejumlah besar molekul besar ini. Sinusoid dikelilingi dan ditunjang selubung serat retikular halus (Mescher, 2012).



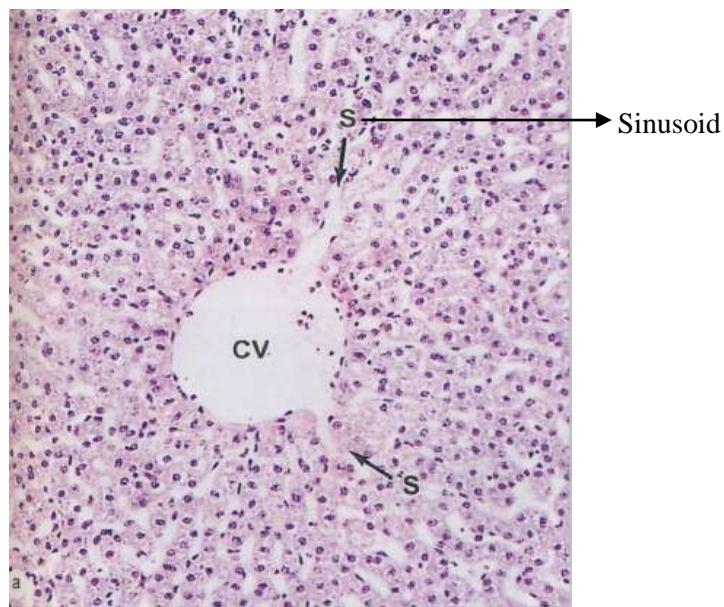
**Gambar 6.** Struktur hepar (Toole & Toole, 1999)

Terdapat dua sel penting yang berhubungan dengan sinusoid yaitu sejumlah besar sel kupffer dan sel penimbun lemak stelata (sel-sel Ito). Sel kupffer ditemukan di antara sel endotel sinusoid dan permukaan luminal di dalam sinusoid, terutama dekat area portalnya, fungsi utamanya adalah menghancurkan eritrosit tua, menggunakan ulang heme, menghancurkan bakteri atau debris yang dapat memasuki darah portal dari usus, dan bekerja sebagai sel penyaji antigen pada imunitas adaptif. Sedangkan sel penimbun lemak stelata terdapat di celah perisinusoid (bukan di lumen), dengan droplet lipid kecil yang mengandung vitamin A, fungsinya antara lain menyimpan banyak vitamin A tubuh, menghasilkan komponen matriks ekstrasel, dan ikut berperan mengatur imunitas setempat (Mescher, 2012).

Sistem porta membawa darah dari pankreas, limpa, dan usus. Nutrien terakumulasi dan diubah dalam hepar, dan zat toksik dinetralkan dan dihilangkan di tempat tersebut. Pada hepar, vena porta bercabang-cabang dan

menjadi venula porta kecil menuju celah portal. Venula portal bercabang menjadi venula pendistribusi kecil yang berjalan di tepi setiap lobulus dan berujung ke dalam sinusoid. Sinusoid berjalan radial, berkonvergensi di pusat lobulus untuk membentuk vena sentralis, seperti terlihat pada gambar 7 (Mescher, 2012).

Venula sentralis dari setiap lobulus menyatu menjadi vena, yang akhirnya membentuk dua atau lebih vena hepatika besar yang bermuara ke dalam vena cava inferior. Arteria hepatika bercabang berulang kali dan membentuk anteriol di area portal dan beberapa di antaranya berakhir langsung ke dalam sinusoid pada jarak-jarak tertentu dari celah porta sehingga darah dari arteri yang kaya oksigen ditambahkan ke dalam vena porta di sinusoid. Darah selalu mengalir dari tepi ke pusat lobulus hepar. Akibatnya, oksigen dan metabolit, serta substansi toksik maupun nontoksik lain yang diserap dalam usus, sampai di sel-sel bagian tepi lebih dulu dan kemudian baru tiba di sel-sel bagian pusat lobules (Mescher, 2012).



**Gambar 7.** Vena sentralis (CV) (Mescher, 2012)

Hepar sebagai organ metabolismik terbesar di tubuh, dipandang sebagai pabrik biokimia utama tubuh. Perannya pada sistem pencernaan adalah sekresi garam empedu, yang membantu pencernaan dan penyerapan lemak. Selain itu juga terdapat berbagai fungsi hepar yang tidak berkaitan dengan pencernaan, yaitu sebagai berikut:

1. Pemrosesan metabolismik kategori utama nutrien (karbohidrat, protein, dan lemak) setelah zat-zat ini diserap dari saluran cerna.
2. Mendetoksifikasi atau menguraikan zat sisa tubuh dan hormon serta obat dan senyawa asing lain. Medium kimia yang aktif dalam hepar dikenal kemampuannya dalam melakukan detoksifikasi atau ekskresi berbagai obat-obatan, meliputi sulfonamid, penisilin, ampisilin, dan eritromisin ke dalam empedu. Dengan cara yang sama, beberapa yang diseckresikan oleh kelenjar endokrin diekskresi atau dihambat secara kimia oleh hepar, meliputi tiroksin dan terutama semua hormon steroid seperti estrogen,

kortisol, dan aldosteron. Kerusakan hepar dapat mengakibatkan penimbunan yang berlebihan dari satu atau lebih hormon ini di dalam cairan tubuh dan menyebabkan aktivitas berlebihan dari sistem hormon.

3. Membentuk protein plasma, termasuk protein yang dibutuhkan untuk pembekuan darah yang mengangkat hormon steroid dan tiroid serta kolesterol dalam darah, dan angiotensinogen yang penting dalam sistem renin-angiotensin-aldosteron (SRAA) yang mengonservasi garam. Zat-zat yang dibentuk di hepar yang digunakan pada proses koagulasi meliputi fibrinogen, protrombin, globulin akselerator, faktor VII, dan beberapa faktor koagulasi penting lain. Vitamin K dibutuhkan oleh proses metabolisme hepar, untuk membentuk protrombin dan faktor VII, IX, dan X. Bila tidak terdapat vitamin K, maka konsentrasi zat-zat ini akan turun secara bermakna, dan keadaan ini mencegah koagulasi darah.
4. Menyimpan glikogen, lemak, besi, tembaga, dan banyak vitamin. Sebagian besar besi di dalam tubuh biasanya disimpan di hepar dalam bentuk feritin. Vitamin yang paling banyak disimpan dalam hepar adalah vitamin A, tetapi sejumlah besar vitamin D dan vitamin B12 juga disimpan secara normal. Jumlah vitamin A yang cukup dapat disimpan selama 10 bulan, sedangkan vitamin D selama 3 sampai 4 bulan, dan vitamin B12 paling sedikit selama 1 tahun.
5. Mengaktifkan vitamin D, yang dilakukan hepar bersama ginjal.
6. Mengeluarkan bakteri dan sel darah merah tua, berkat adanya makrofag residen.

7. Menyekresi hormon trombopoietin (merangsang produksi trombosit), hepsidin (menghambat penyerapan besi dari usus), faktor pertumbuhan mirip insulin-1 (merangsang pertumbuhan).
8. Memproduksi protein fase akut yang penting dalam inflamasi.
9. Mengekskresi kolesterol dan bilirubin. Bilirubin adalah produk penguraian yang berasal dari destruksi sel darah merah tua (Guyton & Hall, 2012; Sherwood, 2016).

## 2.2. Histopatologi Hepar

Hepar mempunyai tugas mempertahankan homeostasis metabolismik tubuh. Penyakit pada hepar mempunyai konsekuensi yang luas karena organ lain sangat bergantung pada fungsi metabolismik hepar. Hepar rentan terhadap berbagai gangguan metabolismik, toksik, mikroba, dan sirkulasi (Robbins *et al.*, 2007). Penyebab penyakit hepar bervariasi, antara lain virus, zat toksik (alkohol atau obat-obatan), genetik, gangguan imunologis, dan kanker (contohnya *hepatocellular carcinoma*) (Suk & Kim, 2012).

Hepar mempunyai lima respons umum terhadap berbagai penyebab cedera hepar, yaitu:

1. Peradangan

Cedera hepatosit yang menyebabkan infilks sel radang akut atau kronis ke hepar disebut hepatitis. Peradangan mungkin terbatas di saluran porta atau mungkin meluas ke dalam parenkim. Jika hepatosit mengalami kerusakan, makrofag akan dengan cepat menelan sel yang mati,

membentuk gumpalan sel radang di parenkim normal. Benda asing, organisme, dan berbagai obat dapat memicu reaksi granulomatosa.

## 2. Degenerasi

Kerusakan akibat gangguan toksik atau imunologis dapat menyebabkan hepatosit membengkak, tampak edematoso (degenerasi balon), dengan sitoplasma irregular bergumpal dan rongga-rongga jernih yang lebar. Selain itu, bahan empedu yang tertahan dapat menyebabkan hepatosit tampak membengkak seperti berbusa (degenerasi busa).

## 3. Kematian sel

Hampir semua gangguan signifikan terhadap hepar dapat menyebabkan destruksi hepatosit. Pada nekrosis tersisa hepatosit yang mengalami mumifikasi dan kurang terwarnai, umumnya akibat iskemia. Kematian sel yang bersifat toksik atau diperantarai sel imun terjadi melalui apoptosis, yang hepatositnya menjadi mengecil, pinotik, sangat eosinofilik. Selain itu hepatosit dapat mengalami pembengkakan osmotik dan pecah . pada iskemia dan sejumlah reaksi obat dan toksin, nekrosis hepatosit tersebar di sekitar vena sentral.

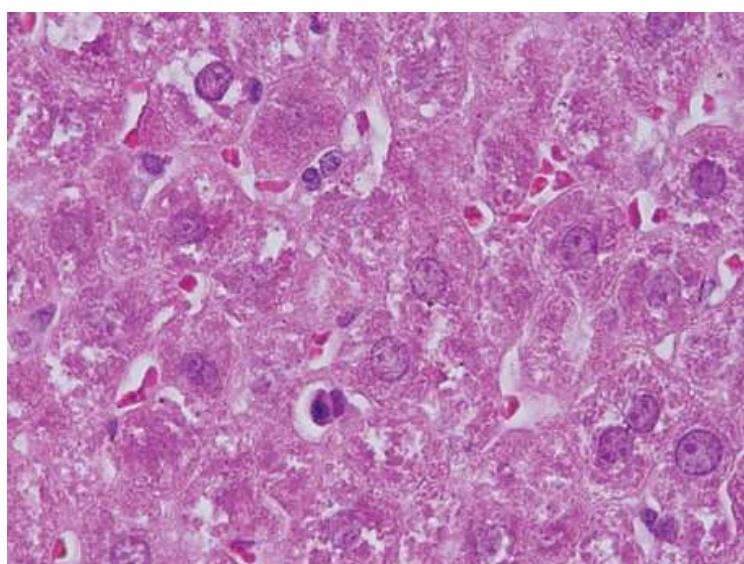
## 4. Fibrosis

Jaringan fibrosa terbentuk sebagai respon terhadap peradangan atau gangguan toksik langsung ke hepar. Pada tahap awal, fibrosis mungkin terbentuk di dalam atau di sekitar saluran porta atau vena sentralis atau mungkin mengendap langsung di dalam sinusoid. Seiring waktu, untai-untai fibrosa menghubungkan region hepar (porta-porta, porta-sentral, sentral-sentral), suatu proses yang disebut *bridging fibrosis*.

## 5. Sirosis

Dengan berlanjutnya fibrosis dan cedera parenkim, hepar terbagi-bagi menjadi nodus hepatosit yang mengalami regenerasi dan dikelilingi oleh jaringan parut, yang disebut sirosis (Robbins *et al.*, 2007).

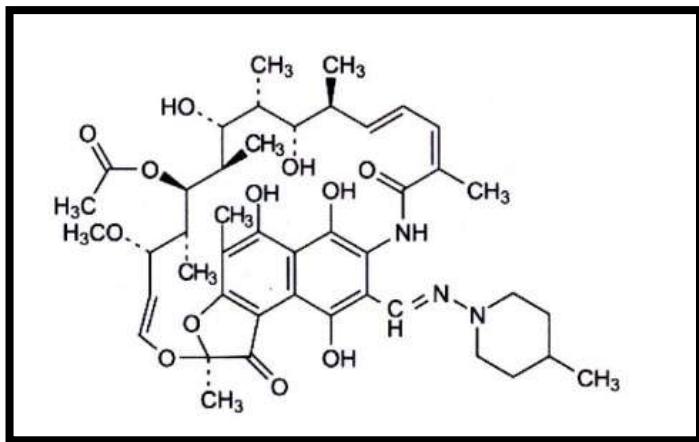
Kerusakan hepar dapat diakibatkan oleh obat, salah satunya adalah obat antituberkulosis (OAT) yaitu rifampisin. Rifampisin dapat menyebabkan hepatotoksisitas, hal tersebut telah ditemukan dalam pengobatan tuberkulosis dan kolestasis. Berdasarkan penelitian dilaporkan pemeriksaan histopatologi hepar yang diinduksi rifampisin menunjukkan nekrosis yang tergantung dosis, degenerasi vakuoler, dan infiltrasi sel radang (Chen & Raymond, 2006). Degenerasi bengkak keruh dapat dilihat pada gambar 8. Penelitian yang dilakukan oleh Dhuley & Naik (1998) melaporkan bahwa hepar yang diinduksi rifampisin 1g/kgBB menunjukkan kerusakan pada hepar (Dhuley & Naik, 1998).



**Gambar 8.** Degenerasi bengkak keruh (Abdelhalim, 2011)

### 2.3. Rifampisin Penyebab Hepatotoksik

Rifampisin merupakan salah satu obat antituberkulosis (OAT) lini pertama (Dirjen P2 & PL, 2014). Rifampisin berasal dari rifampisin B yang dihasilkan oleh *Streptomyces mediterranei* dan telah digunakan sejak tahun 1965 (Sousa *et al.*, 2008). Mekanisme kerja rifampisin dengan cara mengikat subunit  $\beta$  RNA polymerase dependen-DNA bakteri dan karenanya menghambat pembentukan RNA. Rifampisin dapat mematikan organisme yang sulit diakses oleh banyak obat lain, misalnya organisme intrasel dan yang terdapat di dalam abses dan kavitas paru (Katzung *et al.*, 2015).



Gambar 9. Struktur Rifampisin (Dirjen POM,1995)

Rifampisin diserap dengan baik melalui oral dan diekskresikan terutama melalui hepar ke dalam empedu. Obat ini kemudian mengalami resirkulasi enterohepatik, dengan sebagian besar diekskresikan sebagai metabolit deasilasi di tinja dan sebagian kecil diekskresikan di urin (Katzung *et al.*, 2015). Rifampisin sangat lipofilik, 80% terikat dengan plasma protein, terutama  $\alpha$ -1-asam-glikoprotein, dan memiliki waktu paruh 2-5 jam. Karena

lipofilisitasnya tinggi, rifampisin menunjukkan kecenderungan untuk didistribusi dan diserap pada jaringan intraseluler (Sousa *et al.*, 2008).

Rifampisin dideasetilasi oleh enzim mikrosomal hepar, dan juga merupakan penginduksi *cytochrome P450* (CYP450). Hal ini menyebabkan konsentrasi obat menurun dengan mekanisme autoinduksi, dimana obat merangsang metabolisme sendiri menjadi metabolit tidak aktif. Selanjutnya rifampisin mengalami sirkulasi enterohepatik secara progresif dan deasetilasi menjadi metabolit aktif utama, *25-desacetyl-rifampisin*. Rifampisin dengan cepat dieliminasi terutama dalam empedu, 30% diekskresikan dalam urin (Sousa *et al.*, 2008).

Mekanisme yang paling penting di balik interaksi obat rifampisin adalah efek induksi kuat pada aktivitas enzim CYP450 hepar dan usus (CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C8, dan CYP2C18/19). Selain itu rifampisin memiliki peranan penting dalam ambilan obat hepar dan penyerapan obat gastrointestinal sebagai P-glikoprotein, *multi-drug resistance protein* (MRP) penginduksi sistem transportasi, dan inhibitor *organic anion transport protein* 2 (OATP2). Dalam hepar, OATP1 dan OATP2 berlokasi di membran masa sinusoidal hepatosit dan bertanggung jawab untuk penyerapan banyak obat untuk dimetabolisme, MRP2 dan P-glikoprotein berlokasi di membran masa kanalikular dari hepatosit dan bertanggung jawab untuk memompa keluar xenobiotik (obat dan metabolitnya) ke kanal empedu (Sousa *et al.*, 2008).

Mekanisme rifampisin menginduksi enzim CYP adalah dimediasi oleh aktivasi *nuclear pregnane X receptor* (PXR). Rifampisin adalah ligan PXR dan mengaktifkan transkripsi CYP3A4 dan protein lain seperti P-glikoprotein. Reseptor lainnya yaitu *constitutive androstane receptor* (CAR) juga terlibat dalam regulasi transkripsi CYP3A4, tapi rifampisin memiliki efek yang lebih rendah pada CAR dari pada PXR (Sousa *et al.*, 2008).

Rifampisin biasanya digunakan secara klinis dengan dosis 600 mg/hari per oral, harus diberikan bersama isoniazid atau obat antituberkulosis (OAT) lain untuk pasien dengan tuberkulosis aktif untuk mencegah munculnya mikobakteri resisten obat. Pada beberapa terapi jangka pendek, rifampisin 600 mg diberikan 2 kali seminggu. Rifampisin 600 mg/hari atau 2 kali seminggu selama 6 bulan, juga efektif dalam kombinasi dengan obat lain pada beberapa infeksi mikobakteri atipik dan pada kusta. Selain itu, rifampisin 600 mg/hari selama 4 bulan sebagai obat tunggal, merupakan alternatif terhadap isoniazid untuk pasien dengan tuberkulosis laten yang tidak mampu menerima isoniazid atau yang pernah terpajan tuberkulosis aktif yang disebabkan oleh galur resisten isoniazid rentan rifampisin (Katzung *et al.*, 2015).

Rifampisin menyebabkan efek samping berupa warna oranye, yang tidak membahayakan, pada urin, keringat, dan air mata. Efek samping lain yang kadang dijumpai adalah ruam, trombositopeni, dan nefritis. Selain itu, rifampisin dapat menyebabkan ikterus kolestatik dan kadang hepatitis, serta

proteinuria ringan. Pemakaian obat ini dilaporkan berkaitan dengan nekrosis tubular akut (Katzung *et al.*, 2015).

Efek hepatotoksik rifampisin dipengaruhi oleh dosis yang digunakan dan proses metabolisme obat. Dosis hepatotoksik rifampisin pada tikus adalah 1 g/kgBB, dosis tersebut dapat menginduksi peningkatan enzim CYP450, peroksidase lipid, aktivitas *super oxide dismutase* (SOD), trombositopenia, anemia hemolitik, leukopenia transien dan peningkatan *nucleated cell* pada sumsum tulang belakang serta penurunan berat kelenjar thymus secara signifikan pada tikus (Dhuley & Naik, 1998).

Penanda dini dari hepatotoksik adalah peningkatan enzim-enzim transaminase dalam serum yang terdiri dari *aspartate aminotransferase/ serum glutamate oxaloacetate transaminase* (AST/SGOT) yang disekresikan secara paralel dengan *alanine aminotransferase/ serum glutamate pyruvate transaminase* (ALT/SGPT) yang merupakan penanda yang lebih spesifik untuk mendeteksi adanya kerusakan hepar (Prihatni *et al.*, 2005).

Sebuah analisis dari penelitian yang melibatkan beberapa regimen obat antituberkulosis memperkirakan kejadian toksitas hepar adalah 1,1% dengan rifampisin saja. Xenobiotik, termasuk OAT, mengalami biotransformasi di hepar serta dikatalisis oleh sistem enzim mikrosomal. Rifampisin menyebabkan cedera oksidatif hepar, membran, dan organel yang mengarah ke peroksidasi lipid dan penipisan antioksidan *glutathione* (GSH)

dan enzim radikal bebas. Beberapa turunan reaktif dari obat-obatan dan oksidan, dihasilkan selama proses biotransformasi obat. Spesies reaktif yang dihasilkan dapat mengikat dan/atau bereaksi dengan komponen seluler dalam hepar, dan menyebabkan kerusakan hepar yang mengakibatkan penurunan fungsi hepar. Reaksi dari spesies reaktif dengan antioksidan seluler menyebabkan berkurangnya antioksidan yang dapat mengakibatkan stres oksidatif (Swamy *et al.*, 2012).

Penilaian fungsi hepar dapat dilakukan dengan memperkirakan aktivitas enzim *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotrasferase* (ALT), dan *alkaline phosphatase* (ALP), yang seharusnya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dalam sitoplasma. Ketika membran plasma hepar rusak, enzim ini dilepaskan ke dalam aliran darah. Pada penelitian terhadap tikus yang diinduksi rifampisin, menunjukkan secara signifikan peningkatan kadar AST, ALT, ALP, dan bilirubin (total dan langsung) (Swamy *et al.*, 2012).

Stres oksidatif adalah mekanisme utama hepatotoksitas rifampisin yang diinduksi pada tikus percobaan. Rifampisin adalah penginduksi poten sistem CYP450 yang memediasi generasi metabolit toksik obat dan ikatan kovalen ke makromolekul hepar. Kerusakan sel terjadi melalui induksi stres oksidatif, sebagai konsekuensi dari disfungsi sistem pertahanan antioksidan hepar. Lipid peroksidasi adalah proses *autocatalytic*, yang merupakan akibat dari kematian sel. Dalam sebuah penelitian, dilaporkan terdapat peningkatan *malondialdehyde* (MDA) pada tikus yang diberikan rifampisin, hal tersebut

menunjukkan peningkatan peroksidasi lipid yang menyebabkan kerusakan jaringan (Swamy *et al.*, 2012). Radikal bebas yang terbentuk akan berikatan dengan makromolekul hepar yang akan menyebabkan kerusakan hepatosit yang nantinya bisa menyebabkan sampel jaringan hepar mengalami kerusakan yang dinilai melalui peningkatan aktivitas enzim ALT (Gaze, 2007).

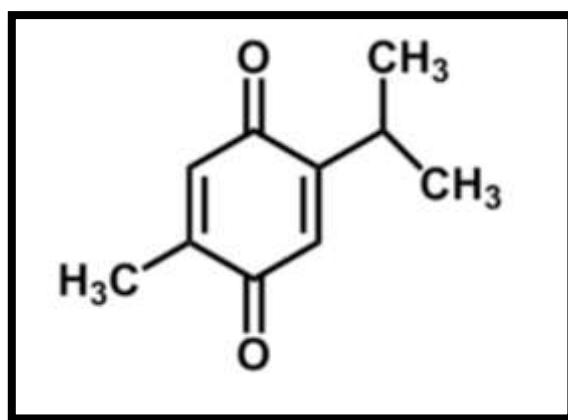
Rifampisin juga dapat menginduksi mediator inflamasi dan meningkatkan produksi sitokin yang diinduksi *nitric oxide* (NO) dan *interleukin 8* (IL-8) dalam epitel sel hepar. NO adalah mediator kekebalan tubuh utama dan penting, bagian dari pertahanan *host* dalam melawan *Mycobacterium tuberculosis*. NO memodulasi produksi beberapa sitokin dan kemokin diantaranya *gamma interferon (IFN- $\gamma$ )*-induced protein-10 (IP-10), mengatur aktivasi *T-cell expressed and secreted protein* (RANTES), *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), *interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ), *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1), dan *interleukin-8* (IL-8), pada tipe sel berbeda dengan mekanisme yang berbeda (Yuhas *et al.*, 2011).

Produksi NO dikendalikan oleh *nitric oxide synthase* (NOS). Kadar yang tinggi dapat dihasilkan tergantung komponen bakteri atau kombinasi dari proinflamasi sitokin, seperti IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ . Meskipun peningkatan kadar NO memiliki efek antimikroba yang menguntungkan, namun NO juga terlibat dalam patogenesis beberapa penyakit inflamasi. Interleukin 8 (IL-8)

adalah kemokin ampuh yang berfungsi sebagai kemoatraktan leukosit pada respon imun dan inflamasi. Hal ini disebabkan oleh produk bakteri dan virus, serta sitokin proinflamasi. IL-8 terlibat dalam respon imun *Mycobacterium tuberculosis* dan telah dikaitkan dengan patologi paru-paru dan penyakit hepar kronis. NO telah dilaporkan memodulasi ekspresi IL-8. Selain itu NO dan IL-8 memberi efek proinflamasi dalam hepar (Yuhas *et al.*, 2011).

#### **2.4. Thymoquinone**

*Thymoquinone* (2-isopropil-5-methylbenzo-1,4-kuinon) termasuk golongan senyawa terpenoid dan merupakan kandungan yang paling menonjol dari jintan hitam. Jintan hitam merupakan tanaman dikotil asli Eropa Selatan, Afrika Utara, dan Asia kecil, dan secara luas dibudidayakan di Pakistan dan India, dengan demikian menjadi tanaman obat tradisional di wilayah tersebut. Tanaman ini juga dikenal sebagai *Black Seed*, *Habbatus Sauda*, *Alhabahat Alsawda*, *Alkamoun Alaswad*, dan di beberapa bagian lain dunia, juga dikenal sebagai *Shuniz*, *Khodhira* (Khairul *et al.*, 2016; Nickavar *et al.*, 2003). Struktur *thymoquinone* dapat dilihat pada gambar 10.



**Gambar 10.** Struktur *thymoquinone* (Ahmad *et al.*, 2015)

*Thymoquinone* terbukti memiliki berbagai manfaat yang baik bagi kesehatan sebagai antiinflamasi dan imunomodulator (Sulistri & Radji, 2014), antiparasit (Hapsari, 2011), antibakteri (Hosseinzadeh *et al.*, 2007), antioksidan (Alenzi *et al.*, 2013), serta proteksi terhadap nefrotoksitas dan hepatotoksitas (Purnomo, 2008; Shiddiqi, 2008). Menurut penelitian Alsaif, dilaporkan bahwa kandungan aktif utama dari minyak atsiri jintan hitam yaitu *thymoquinone*, dapat mencegah kerusakan hepar pada tikus putih yang diinduksi etanol melalui mekanisme sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Alsaif, 2007). Selain itu *thymoquinone* memiliki efek sitoprotektif melalui mekanisme antioksidan (Mousavi *et al.*, 2010).

## **2.5. *Thymoquinone* sebagai hepatoprotektif**

*Thymoquinone* sebagai bahan aktif utama jintan hitam, bertanggung jawab sebagai hepatoprotektif melalui sifat antioksidan dan antiinflamasi dalam mencegah dan melindungi hepar dari kerusakan. Beberapa studi telah menunjukkan efek perlindungan dari kerusakan hepar yang dihasilkan oleh ROS dengan sifat pembersih radikal bebas dan meningkatkan pertahanan antioksidan dalam tubuh (Mollazadeh & Hosseinzadeh, 2014).

*Thymoquinone* memiliki kemampuan untuk menghambat *iron-dependent* peroksidasi lipid dengan cara *concentrations-dependent*. Dengan karakteristik ini, *thymoquinone* dapat mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan pertahanan antioksidan dalam tubuh. Penurunan malondialdehid dan biomarker lain dari stres oksidatif secara paralel dengan peningkatan total

kandungan *thiol* dan tingkat *glutathione* adalah hasil dari pengobatan *thymoquinone*. Kandungan *glutathione* dalam hepar ditemukan tinggi konsentrasinya terutama di dalam hepar dan dikenal memiliki fungsi penting dalam mekanisme pelindung seluler (Seronello *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2005; El-Tawil & Moussa, 2006).

*Thymoquinone* menghambat aktivitas isozim hepar CYP1A1/A2 terlibat dalam biotransformasi dari banyak xenobiotik ke reaktif derivatif radikal genotoksik (Fouda *et al.*, 2014). Pemberian secara oral *thymoquinone* terbukti sebagai agen profilaksis yang menjanjikan terhadap karsinogenesis kimia dan toksitas pada jaringan hepar dengan meningkatkan aktivitas reduktase kuinon dan *glutathione transferase*. Selain itu, *thymoquinone* dapat menghambat ekspresi iNOS, yang berpartisipasi dalam keadaan stres oksidatif dan dapat meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti *glutathione peroxidase* (GSHPx) dan *super oxide dismutase* (SOD) (Sayed-ahmed *et al.*, 2010; Al-Okbi *et al.*, 2013)

Berikut rangkuman mekanisme *thymoquinone* sebagai antioksidan :

1. *Thymoquinone* menghambat iron-dependent peroksidasi lipid
2. *Thymoquinone* meningkatkan total konten *thiol* dan tingkat GSH
3. *Thymoquinone* adalah O<sub>2</sub> dan OH pembersih radikal
4. *Thymoquinone* menghambat aktivitas isozim hepar CYP1A1/A2
5. *Thymoquinone* meningkatkan aktivitas reduktase kuinon, katalase, SOD dan *glutathione transferase* (Mollazadeh & Hosseinzadeh, 2014).

Penggunaan *thymoquinone* juga telah ditunjukkan memiliki efek antiinflamasi dalam beberapa penyakit inflamasi. Sitokin inflamasi di hepatosit dapat mempromosikan jalur sinyal yang menginduksi kerusakan sel. *Thymoquinone* adalah inhibitor poten generasi eicosanoid yaitu tromboksan B2 dan leukotrien B4, dengan menghambat baik sikloksigenase dan lipoxygenase enzim ( El-Tawil & Moussa, 2006).

*Thymoquinone* meningkat dalam rasio pembantu untuk sel T penekan, meningkatkan aktivitas sel pembunuh alami, meningkatkan produksi IL-3 dan memiliki efek stimulasi pada makrofag. Respon inflamasi dan aktivasi neutrofil dapat meningkatkan aktivitas *myeloperoxidase* di jaringan hepar. *Myeloperoxidase* meningkatkan peroksidasi lipid dan pembentukan radikal bebas. Keadaan ini dapat memperburuk kerusakan hepar (Badary *et al.*, 2000).

*Thymoquinone* dapat mengurangi inflamasi dengan mengurangi *malondialdehid* dan peroksidasi lipid, pengurangan jumlah sitokin melalui menghambat aktivitas *nuclear factor kappa beta* (NF-Kb), dan untuk mengurangi *cytochrome c* produksi dari mitokondria melalui penghambatan menghasilkan ROS dalam hepar (Badary *et al.*, 2000).

Berikut rangkuman mekanisme antiinflamasi *thymoquinone*:

1. *Thymoquinone* menghambat baik sikloksigenase dan lipokksigenase

2. *Thymoquinone* meningkatkan rasio sel T pembantu sampai sel T penekan, peningkatan aktivitas sel pembunuh alami, peningkatan produksi IL-3 dan memiliki efek stimulasi pada makrofag
3. *Thymoquinone* menghambat reduksi NF-K $\beta$  produksi *cytochrome c*
4. *Thymoquinone* penghambatan pembentukan prostaglandin E2 (PG E2) (Mollazadeh & Hosseinzadeh, 2014).

## **2.6. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley***

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan pengerat dan sering digunakan untuk penelitian, dikarenakan tikus merupakan hewan yang mewakili dari kelas mamalia, sehingga kelengkapan organ, kebutuhan nutrisi, metabolisme biokimianya, sistem reproduksi, pernafasan, peredaran darah dan ekskresi menyerupai manusia. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri yaitu albino, kepala kecil dan ekor lebih panjang dibandingkan badannya, pertumbuhan cepat, tempramen baik, kemampuan laktasinya tinggi dan tahan terhadap perlakuan (Isroi, 2010).

Dibandingkan dengan tikus liar, tikus putih lebih cepat menjadi dewasa dan lebih mudah berkembang biak. Berat badan tikus putih lebih ringan dibandingkan berat badan tikus liar dan mencit membuat tikus putih (*Rattus norvegicus*) lebih disukai untuk penelitian. Biasanya pada umur empat minggu beratnya 35-40 gram, dan berat dewasa rata-rata 200-250 gram (FKH UGM, 2006). Tikus juga dapat secara alami menderita suatu penyakit seperti

hipertensi dan diabetes, dan juga sering dipakai dalam studi nutrisi, tingkah laku, kerja obat, dan toksikologi (*Animal Care Program*, 2011).



**Gambar 11.** Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* (Akbar, 2010)

Sebuah galur atau strain tikus, adalah kelompok tikus dengan semua anggota secara genetik identik. Tikus *Sprague dawley* yang merupakan jenis tikus albino serbaguna digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya. Rata-rata ukuran berat tubuh tikus *Sprague dawley* adalah 10,5 g. Berat badan dewasa adalah 250-300g bagi betina, dan 450-520g untuk jantan. Lama hidupnya adalah 2,5-3,5 tahun (Isroi, 2010).

**Tabel 1.** Data Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley*

<b>DATA BIOLOGI</b>	<b>KETERANGAN</b>
Lama hidup	2,5-3,5 tahun
	<b>Berat Badan</b>
<i>Newborn</i>	5-6 g
Pubertas	150-200 g
Dewasa jantan	300-800 g
Dewasa betina	200-400 g
	<b>Reproduksi</b>
Kematangan seksual	65-110 hari
Siklus estrus	4-5 hari
Gestasi	20-22 hari
Penyapihan	21 hari
	<b>Fisiologi</b>
Suhu tubuh	35,90-37,50 C
Denyut Jantung	250-600 kali/menit
Laju nafas	66-144 kali/menit
Tekanan darah diastolic	60-90 mmHg
Tekanan darah sistolik	75-120 mmHg
Feses	Padat, berwarna coklat tua, bentuk memanjang dengan ujung membulat
Urin	Jernih dan berwarna kuning
	<b>Konsumsi makan dan air</b>
Konsumsi makanan	15-30 g/hari atau 5-6 g/100Gbb
Konsumsi air	24-60 ml/hari atau 10-12 ml/100Gbb

(Sumber: Isroi, 2010)

## 2.7. Kerangka Teori

Rifampisin mempunyai efek induksi kuat pada aktivitas enzim CYP450 hepar dan usus (CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C8, dan CYP2C18/19). Mekanisme rifampisin menginduksi enzim CYP adalah dimediasi oleh aktivasi *nuclear pregnane X receptor* (PXR). Rifampisin adalah ligan PXR dan mengaktifkan transkripsi CYP3A4 dan protein lain seperti P-glikoprotein. Rifampisin sebagai penginduksi poten sistem CYP-450, memediasi generasi metabolit toksik obat dan ikatan kovalen ke makromolekul hepar. Kerusakan sel terjadi melalui induksi stres oksidatif, sebagai konsekuensi dari disfungsi sistem pertahanan antioksidan hepar. Pada

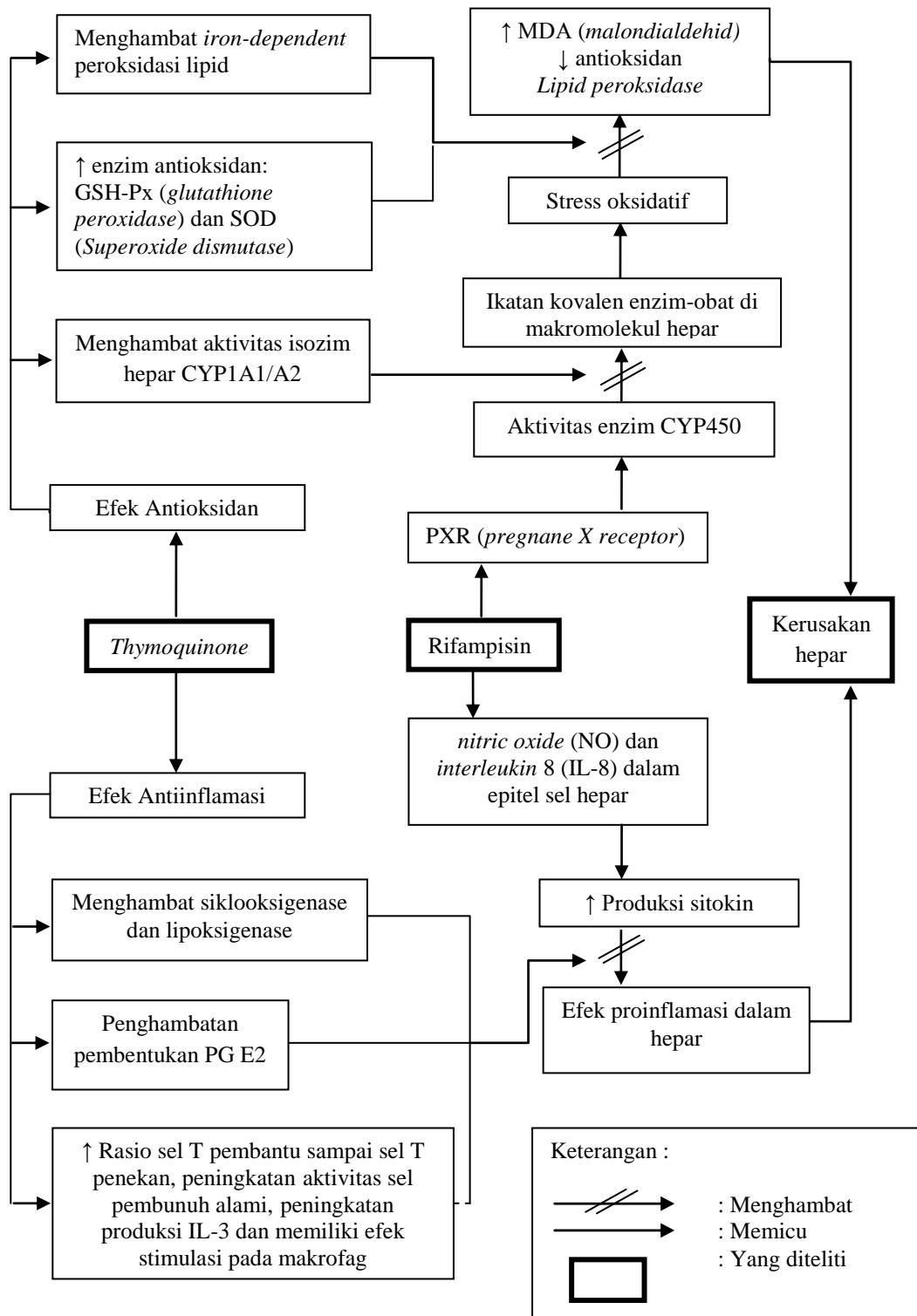
pemberian rifampisin, terdapat peningkatan *malondialdehyde* (MDA), hal tersebut menunjukkan peningkatan peroksidasi lipid yang menyebabkan kerusakan jaringan. Selanjutnya radikal bebas yang terbentuk akan berikatan dengan makromolekul hepar yang akan menyebabkan kerusakan hepatosit.

Rifampisin juga dapat menginduksi mediator inflamasi dan meningkatkan produksi sitokin yang diinduksi *nitric oxide* (NO) dan *interleukin 8* (IL-8) dalam epitel sel hepar. NO adalah mediator kekebalan tubuh utama dan penting, bagian dari pertahanan *host* dalam melawan *Mycobacterium tuberculosis*. NO terbukti terlibat dalam patogenesis beberapa penyakit inflamasi. Interleukin 8 (IL-8) adalah kemokin ampuh yang berfungsi sebagai kemoatraktan leukosit pada respon imun dan inflamasi. IL-8 terlibat dalam respon imun *Mycobacterium tuberculosis*. NO telah dilaporkan memodulasi ekspresi IL-8. Selain itu, NO dan IL-8 memberi efek proinflamasi dalam hepar.

*Thymoquinone* bertanggung jawab sebagai hepatoprotektif melalui sifat antioksidan dan antiinflamasi dalam mencegah dan melindungi hepar dari kerusakan. *Thymoquinone* memiliki kemampuan untuk menghambat *iron-dependent* peroksidasi lipid dengan cara *concentrations-dependent*. Dengan karakteristik ini, *thymoquinone* dapat mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan pertahanan antioksidan dalam tubuh. Penurunan malondialdehid dan biomarker lain dari stres oksidatif secara paralel dengan

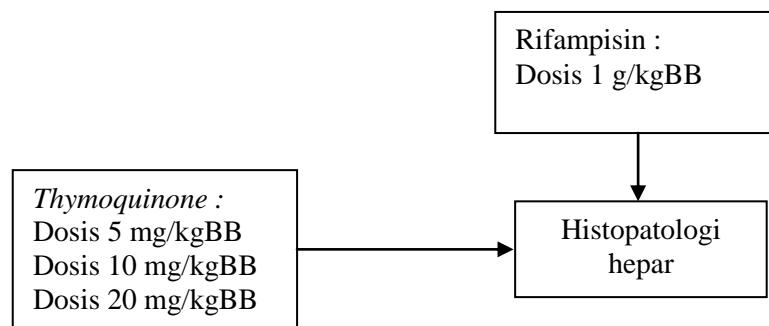
peningkatan total kandungan *thiol* dan tingkat *glutathione* adalah hasil dari pengobatan *thymoquinone*.

*Thymoquinone* menghambat aktivitas isozim hepar CYP1A1 /A2 terlibat dalam biotransformasi dari banyak xenobiotik ke reaktif derivatif radikal genotoksik. Selain itu, *thymoquinone* dapat meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti *glutathione peroxidase* (GSHPx) dan *super oxide dismutase*. Penggunaan *thymoquinone* juga memiliki efek antiinflamasi. *Thymoquinone* adalah inhibitor poten generasi eicosanoid yaitu tromboksan B2 dan leukotrien B4, dengan menghambat baik siklooksigenase dan lipoxygenase enzim. *Thymoquinone* juga meningkat dalam rasio pembantu untuk sel T penekan, meningkatkan aktivitas sel pembunuh alami, meningkatkan produksi IL-3 dan memiliki efek stimulasi pada makrofag. *Thymoquinone* dapat mengurangi inflamasi dengan mengurangi *malondialdehid* dan peroksidasi lipid, pengurangan jumlah sitokin melalui menghambat aktivitas NF-kB, dan untuk mengurangi *cytochrome c* produksi dari mitokondria melalui penghambatan menghasilkan ROS dalam hepar. Selain itu, *Thymoquinone* penghambatan pembentukan PG E2.



**Gambar 12.** Kerangka teori efek protektif *thymoquinone* terhadap histopatologi hepar yang diinduksi rifampisin

## 2.8. Kerangka Konsep



**Gambar 13.** Kerangka konsep

## 2.9. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin.
2. Terdapat pengaruh peningkatan dosis pada efek protektif *thymoquinone* terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi rifampisin.

## **BAB 3** **METODE PENELITIAN**

### **3.1. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only control group design*.

### **3.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk proses pemeliharaan dan perlakuan, pembuatan preparat dilakukan di laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bandar Lampung, dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama 4 bulan yang terhitung mulai bulan september sampai desember 2016.

### **3.3. Populasi dan Sampel**

#### **3.3.1. Populasi Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10 sampai 16 minggu yang diperoleh

dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Palembang.

### **3.3.2. Sampel Penelitian**

Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Digunakan 5 kelompok untuk mengetahui bagaimana keadaan normal hepar, dan kerusakan hepar yang hanya diinduksi rifampisin serta pengaruh *thymoquinone* terhadap kerusakan tersebut. Pembagian 5 kelompok akan dijelaskan pada subbab selanjutnya. Banyaknya jumlah sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Freuderer (Frederer, 1991).

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

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

t = banyak kelompok

Besar sampel yang dibutuhkan untuk tiap kelompok:

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

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

Berdasarkan perhitungan tersebut, dalam percobaan ini digunakan sampel sebesar 5 ekor tikus putih untuk tiap kelompok, sehingga jumlah total sampel yang digunakan adalah 25 ekor. Untuk mengantisipasi adanya kriteria eksklusi maka dilakukan koreksi dengan menambahkan 10% dari jumlah anggota tiap kelompok.

$$\begin{aligned} & 10\% \times 5 \\ & = 0,5 \text{ per kelompok} \\ & \quad \text{perlakuan} \end{aligned}$$

Jadi, sampel yang dibutuhkan untuk cadangan sebanyak 1 ekor tikus per kelompok perlakuan. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok.

### **3.3.3. Kelompok Perlakuan**

#### **1. Kelompok kontrol negatif (K1)**

Kelompok tikus yang hanya diberi akuades, namun tidak diinduksi rifampisin dan tidak diberikan *thymoquinone*.

#### **2. Kelompok kontrol positif (K2)**

Kelompok tikus yang diinduksi dengan rifampisin 1 g/kgBB selama 14 hari.

#### **3. Kelompok perlakuan 1 (P1)**

Kelompok tikus yang diinduksi rifampisin 1 g/kgBB dan diikuti dengan pemberian *thymoquinone* dosis 5 mg/kgBB/hari selama 14 hari.

4. Kelompok perlakuan 2 (P2)

Kelompok tikus yang diinduksi rifampisin 1 g/kgBB dan diikuti dengan pemberian *thymoquinone* dosis 10 mg/kgBB/hari selama 14 hari.

5. Kelompok perlakuan 3 (P3)

Kelompok tikus yang diinduksi rifampisin 1 g/kgBB dan diikuti dengan pemberian *thymoquinone* dosis 20 mg/kgBB/hari selama 14 hari.

*Thymoquinone* merupakan bahan aktif dalam bentuk serbuk, sehingga harus dilarutkan terlebih dahulu dalam minyak zaitun. Oleh karena itu, setiap kelompok diberikan minyak zaitun sebanyak 0,5 ml untuk K1 dan K2, sedangkan P1, P2, P3 telah diberikan dalam bentuk campuran dengan *thymoquinone*.

#### **3.3.4. Kriteria Inklusi**

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
2. Memiliki berat badan 200-300 gram
3. Berjenis kelamin jantan
4. Berusia ± 10 sampai 16 minggu

### **3.3.5. Kriteria Eksklusi**

1. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, serta genital)
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium
3. Mati selama masa pemberian perlakuan

## **3.4. Bahan dan Alat Penelitian**

### **3.4.1. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian terdiri dari *thymoquinone* yang didapat dari SIGMA ALDRICH dan rifampisin yang didapat dari apotik. Bahan penelitian *thymoquinone* dengan dosis 5 mg/kgBB, 10 mg/kgBB, dan 20 mg/kgBB serta rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB diberikan secara oral melalui sonde lambung. Bahan tambahan berupa makanan hewan, dan akuades.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan El-sheikh (2015), melaporkan dosis *thymoquinone* 10 mg/kg per oral terbukti mempunyai mekanisme proteksi hepatorenal melalui efek antiinflamasi, antioksidan, antiapoptosis, dan antinitrosatif. Pemilihan 2 dosis lainnya didapatkan dari setengah dosis dan 2 kali dosis 10 mg/kg, dikarenakan untuk mengetahui apakah dengan dosis tersebut *thymoquinone* tetap

memiliki efek protektif. Pemberian *thymoquinone* selang 2 jam setelah rifampisin agar rifampisin diabsorbsi terlebih dahulu, hal tersebut juga berdasarkan penelitian sebelumnya, yaitu pemberian obat tradisional setelah 2 jam pemberian rifampisin (Clarinta *et al.*, 2015; Saraswati *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian Dhuley & Naik (1998) melaporkan bahwa dosis rifampisin 1 g/kgBB terbukti hepatotoksik, sejalan dengan penelitian putri (2014) bahwa dosis 1 g/kgBB selama 14 hari dapat menyebabkan kerusakan hepar.

### **3.4.2. Bahan kimia**

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin meliputi larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol teknis, xilol, akuades, pewarna haematoxylin dan eosin, paraffin, kanada balsam.

### **3.4.3. Perangkat Penelitian**

#### **1. Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah:

- a. Neraca analitik untuk menimbang berat tikus
- b. Spuit oral 1 cc dan 3 cc
- c. Minor set
- d. Kapas dan alkohol
- e. Alat pemeriksaan mikroskopis: Mikroskop, gelas objek, cairan emersi

## 2. Alat Pembuat Preparat Histopatologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah *object glass, deck glass, embedding cassette, rotary microtome, oven, water bath, platening table, autochnicom processor, staining jar, staining rak, kertas saring, histoplast, dan paraffin dispenser.*

## 3.5. Prosedur Penelitian

### 1. Adaptasi Tikus

Tikus sebanyak 25 ekor dibagi atas 5 kelompok diadaptasi selama 1 minggu di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dan dilakukan penimbangan dan penandaan untuk menentukan perlakuan perkelompok.

### 2. Prosedur Pemberian *Thymoquinone*

*Thymoquinone* yang didapat dari SIGMA ALDRICH merupakan *thymoquinone* bentuk serbuk, sehingga harus dilarutkan terlebih dahulu. *Thymoquinone* tidak larut dalam air (Al-ali *et al.*, 2008), sehingga dilarutkan dalam minyak zaitun terlebih dahulu (Al-ali *et. al*, 2008; Kiziltan *et. al*, 2016). Dosis *thymoquinone* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 mg/kgBB, 10 mg/kgBB, dan 20 mg/kgBB, masing-masing dosis tersebut akan dilarutkan dalam 0,5 ml minyak zaitun. Hal ini berarti sebagai berikut:

- a. Dosis untuk kelompok I

Pada tikus berat rata-rata 200 g maka dosis per ekor tikus sebesar :

$200 \text{ g} = 0,2 \text{ kg}$ , maka  $5 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 1 \text{ mg}$  (per ekor tikus)

b. Dosis untuk kelompok II

Pada tikus berat rata-rata 200 g maka dosis per ekor tikus sebesar :

$200 \text{ g} = 0,2 \text{ kg}$ , maka  $10 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 2 \text{ mg}$  (per ekor tikus)

c. Dosis untuk kelompok III

Pada tikus berat rata-rata 200 g maka dosis per ekor tikus sebesar :

$200 \text{ g} = 0,2 \text{ kg}$ , maka  $20 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 4 \text{ mg}$  (per ekor tikus)

### 3. Prosedur Pemberian Rifampisin

Dosis rifampisin yang digunakan adalah 1 g/kgBB per oral. Berat tikus yang digunakan dalam penelitian adalah 200 g sampai 300 g, di bawah ini contoh perhitungan dosis rifampisin jika berat tikus 200 g atau 0,2 kg:

$$1 \text{ g/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 0,2 \text{ gram} = 200 \text{ mg} \text{ (per ekor tikus)}$$

Dosis rifampisin yang dipilih adalah rifampisin tablet sediaan 600 mg, hal ini dikarenakan pemberian peroral. Rifampisin tablet digerus dan dilarutkan dalam 6 ml akuades. Jadi dalam 1ml larutan rifampisin terdapat 100 mg. Pemberian larutan rifampisin akan disesuaikan dengan berat badan tikus.

### 4. Prosedur Penelitian

a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok.

Kelompok 1 sebagai kontrol negatif, hanya diberi akuades. Kelompok

2 sebagai kontrol positif, diberikan rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB.

Kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian rifampisin dosis 1 g/kgBB, kemudian selang 2–4 jam dilakukan pemberian *thymoquinone* dosis 5 mg/kgBB untuk kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2 dengan dosis *thymoquinone* sebanyak 10 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan 3 dengan dosis *thymoquinone* sebanyak 20 mg/kgBB. Pemberian rifampisin dan *thymoquinone* diberikan selama 14 hari.

- b. Dilakukan laparotomi pada tikus yang telah dinarkosis dengan ketamin dan diambil hepar untuk dibuat sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan *Hematoksilin & Eosin*.
- c. Sampel hepar difiksasi dengan formalin 10% dan dikirim ke laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bandar Lampung untuk pembuatan sediaan mikroskopis jaringan hepar. Pembuatan sediaan akan dikerjakan oleh staff ahli laboratorium patologi anatomi Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bandar Lampung.
- d. Metode teknik histopatologi yaitu:
  - 1) *Fixation*
    - a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ hepar yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.
    - b) Mencuci dengan air mengalir.
  - 2) *Trimming*
    - a) Mengcincillkan organ ±3 mm.

- b) Memasukkan potongan organ hepar tersebut ke dalam *embedding cassette*.
- 3) *Dehidrasi*
- Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.
  - Berturut-turut melakukan perendaman organ hepar dalam alkohol bertingkat 80% dan 95% masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan perendaman alkohol 95%, absolut I, II, III selama 1 jam.
- 4) *Clearing*
- Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan clearing dengan xilol I, II, III masing-masing selama 1 jam.
- 5) *Impregnasi*
- Impregnasi* dengan menggunakan paraffin I, II, III masing-masing selama 2 jam.
- 6) *Embedding*
- Membersihkan sisa paraffin yang ada pada pan dengan memanaskan beberapa saat diatas api dan usap dengan kapas.
  - Menyiapkan paraffin cair dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan memasukkan ke dalam oven dengan suhu diatas 580 C.
  - Menuangkan paraffin cair ke dalam pan.
  - Memindahkan satu-persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.

- e) Memasukkan pan ke dalam air.
- f) Melepaskan paraffin yang berisi potongan hepar dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu 4-60 C beberapa saat.
- g) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel hangat.
- h) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- i) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

7) *Cutting*

- a) Melakukan pemotongan pada ruangan dingin.
- b) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
- c) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
- d) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- e) Memindahkan lembaran jaringan kedalam *waterbath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- f) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tengan atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.

g) Menempatkan *slide* yang berisi jaringan pada inkubator (suhu 370 C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8) *Staining* (pewarnaan) dengan *Harris Hematoxylin Eosin*

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut. Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga yaitu akuades selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan dalam zat warna Harris Hematoxylin selama 20 menit. Kemudian memasukkan potongan organ hepar dalam akuades selama 1 menit dengan sedikit menggoyang-goyangkan organ. Keenam, mencelupkan organ dalam asam alkohol 2-3 celupan. Ketujuh, dibersihkan dalam akuades bertingkat masing-masing 1 dan 15 menit. Kedelapan, memasukkan potongan organ dalam eosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir memasukkan kedalam xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

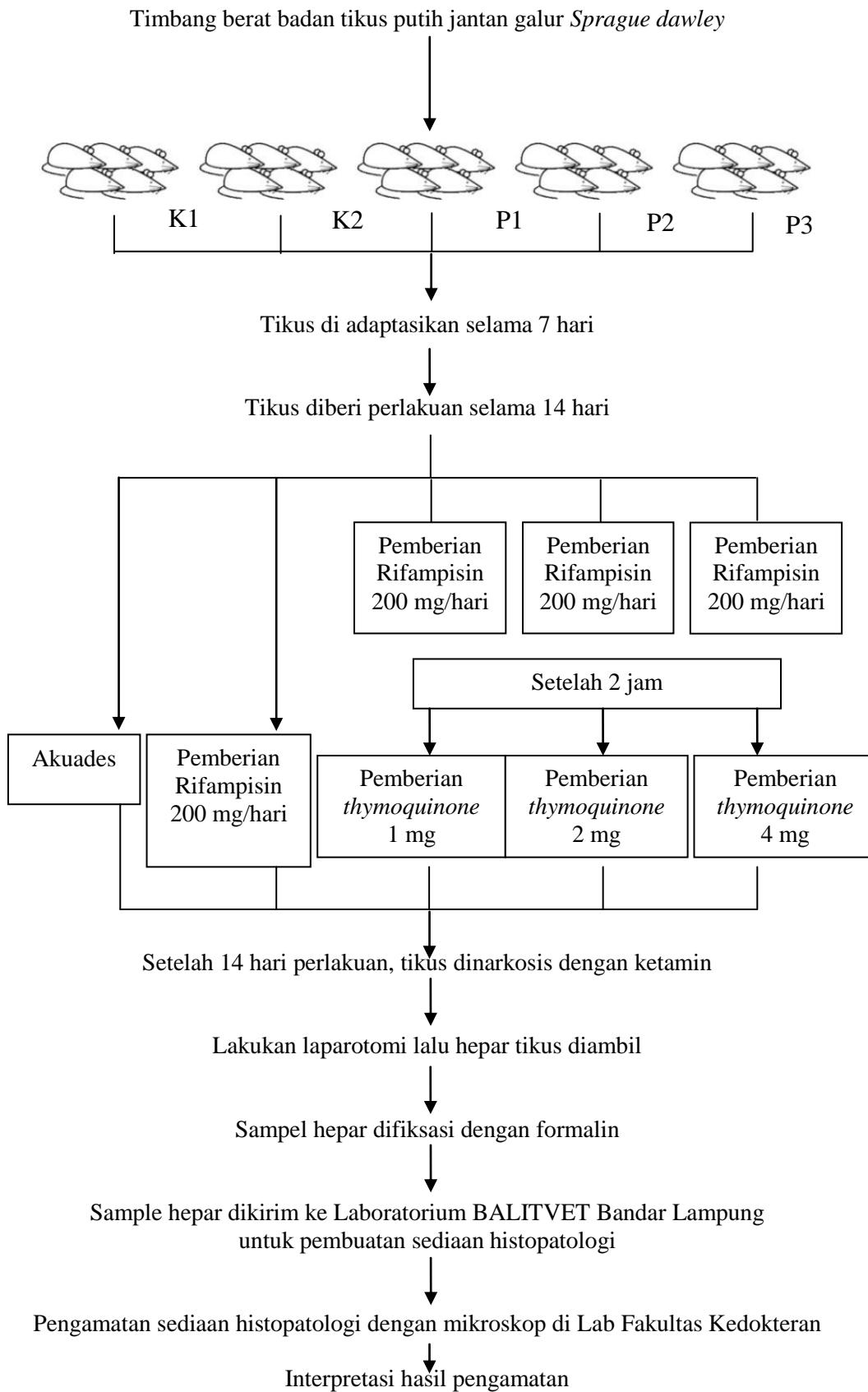
9) *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan *slide* diatas kertas tisu pada tempat datar, menetes dengan bahan *mounting* yaitu kanada

balsam dan ditutup dengan *cover glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

10) Membaca slide dengan mikroskop

*Slide* diperiksa di bawah mikroskop sinar dengan pembesaran 400x. Metode yang digunakan dalam melihat preparat adalah prosedur *double blinded*.



**Gambar 14.** Diagram alur penelitian

### **3.6. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.6.1. Identifikasi Variabel**

- a. Variabel Independen:
  1. Perlakuan coba: pemberian *thymoquinone*
  2. Perlakuan kontrol positif: pemberian rifampisin tanpa pemberian *thymoquinone*
  3. Perlakuan kontrol negatif: pemberian akuades
- b. Variabel dependen adalah gambaran histopatologi hepar tikus.

#### **3.6.2. Definisi Operasional Variabel**

**Tabel 2. Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
<i>Thymoquinone</i>	Pemberian <i>thymoquinone</i> sintesis yang dibeli dari perusahaan kimia	Alat ukur dosis	Dosis <i>thymoquinone</i> (1 mg, 2 mg, 4 mg)	Numerik
Histopatologi hepar	Gambaran histopatologi hepar dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang berdasarkan ada tidaknya degenerasi bengkak keruh hepatosit tiap lapangan pandang kemudian ditentukan persentasenya	Mikroskop cahaya	Degenerasi bengkak keruh: 0-100% (Perdana, 2013)	Numerik

### **3.7. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan program SPSS versi 22.0. Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data (*Sapiro-Wilk*). Setelah dilakukan uji normalitas didapatkan distribusi data tidak normal maka digunakan analisis non parametrik *Kruskal-Wallis* yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

### **3.8. Ethical Clearance**

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 077/UN26.8/DL/2017 untuk melakukan penelitian menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley*.

## **BAB 5** **KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1. Kesimpulan**

1. *Thymoquinone* mempunyai efek hepatoprotektif.
2. Terdapat peningkatan efek hepatoprotektif dengan peningkatan dosis 5 mg/kgBB dan 10 mg/kgBB, namun tidak pada dosis 20 mg/kgBB

### **5.2. Saran**

1. Peneliti lain disarankan untuk menguji efek protektif *thymoquinone* terhadap organ lainnya.
2. Peneliti lain disarankan untuk meneliti lebih lanjut terkait dosis minimal *thymoquinone* yang dapat memberikan efek protektif.
3. Peneliti lain disarankan untuk menggunakan rifampisin dalam bentuk murni bukan campuran yang didapat dari apotik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhalim, M.A.K., & Jarrar, B.M. 2011. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. *Lipids in Health and Disease*. 10: 166.
- Ahmad, Z., Laughlin, T.F., & Kady, I.O. 2015. Thymoquinone inhibits *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. *Plos One*. 10(5): 1–12.
- Akbar B. 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilisasi*. Jakarta: Adabia Press.
- Al-Ali, A., Alkhawajah, A.A., Randhawa, M.A., & Shaikh, N.A. 2008. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*. 20(2): 25–7.
- Alenzi, F.Q., Altamimi, M.A.A., Kujan, O., Tarakji, B., Tamimi, W., Bagader, O., et al. 2013. Antioxidant properties of *Nigella sativa*. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*. 7(3): 3–7.
- Ali, B.H., & Blunden, G. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research*. 17(4): 299–305.
- Al-Naqaep, G.N., Ismail, M.M., Al-Zubairi, A.S., & Esa, N.M. 2009. Nutrients composition and minerals content of three different samples of *Nigella sativa* L. cultivated in Yemen. *Asian Journal of Biological Sciences*. 2: 43–48.
- Al-Okbi, S.Y., Mohamed, D.A., Hamed, T.E., Edris, A.E. 2013. Potential protective effect of *Nigella sativa* crude oils towards fatty liver in rats. *Eur J Lipid Sci Technol*. 115: 774–82.
- Alsaif, M.A. 2007. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in wistar rats. *Journal of Medical Sciences*. 7(7): 1164–70.
- Animal Care Program. 2011. *Animal specific training: Rats*. Milwaukee: University of Wisconsin Milwaukee.

- Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal el-Din, A.M., Abdel-Wahab, M.H. 2003. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol.* 26: 87-98.
- Bai, T., Yang, Y., Wu, Y.L., Jiang, S., Lee, J.J., Lian, L.H., et al. 2014. Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice. *Int Immunopharmacol.* 19: 351-57.
- Balitbang Depkes. 2013. *Riset kesehatan dasar*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Chen, J., & Raymond, K. 2006. Roles of rifampicin in drug-drug interactions: Underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 5(3): 1-11.
- Dewi, U.K., & Saraswati, T.R. 2009. Efek rebusan daun tapak dara pada dosis dan frekuensi yang berbeda terhadap kerusakan dan akumulasi glikogen pada hepar mencit (*Mus musculus*). *Bioma.* 11(1): 1-5.
- Dhuley, J.N., & Naik, S.R. 1998. Modulation of rifampicin toxicity by 6 MFA, an interferon inducer obtained from fungus *Aspergillus ochraceus*. Department of Pharmacology and Toxicology, Research Centre, Hindustan Antibiotics Limited, Pimpri.
- Dirjen Binfar & Alkes. 2007. *Pharmaceutical care untuk penyakit hepar*. Jakarta: Depkes RI.
- Dirjen P2 & PL. 2011. *Terobosan menuju akses universal: Strategi nasional pengendalian TB di Indonesia 2010-2014*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Dirjen P2 & PL. 2014. *Pedoman nasional pengendalian tuberkulosis*. Katalog Dalam Terbitan: Kementerian Kesehatan Nasional. Jakarta: Kemenkes RI.
- Dirjen POM. 1995. *Farmakope Indonesia* Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1083-84.
- El-sheikh, A.A.K., Morsy, M.A., Abdalla, A.M., Hamouda, A.H., & Alhaider, I.A. 2015. Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats.
- El-Tawil, O., & Moussa, S.Z. 2006. Antioxidant and hepatoprotective effects of thymoquinone against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in isolated rat hepatocyte. *J Egypt Soc Toxicol.* 34: 33-41.
- Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) UGM. 2006. *Tikus laboratorium*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

- Federer, W. 1991. *Statistics and society: Data collection and interpretation*. New York: Marcel Dekker.
- Fouda, A.M.M., Daba, M.H.Y., Yousef, & Ahmed, A.R. 2014. Antigenotoxic effects of thymoquinone against benzo[a]pyrene and mitomycin C -induced genotoxicity in cultured human lymphocytes. *Research in Immunology: An International Journal*.
- Gaze, D.C. 2007. The role of existing and novel cardiac biomarkers for cardioprotection. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England : 2000)*. 8(9): 711–7.
- Gordon. 1990. *The mechanism of antioxidant action in vitro*. London: Science Publisher.
- Guyton, A C., & Hall, J. E. 2012. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Hapsari, D.A. 2011. Pengaruh pemberian minyak jintan hitam (*Nigella sativa*) dosis bertingkat terhadap parasitemia mencit balb-c yang diinduksi plasmodium berghei. [Skripsi]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Hosseinzadeh, H., Bazzaz, B.S.F., & Haghi, M.M. 2007. Antibacterial activity of total extracts and essential oil of *Nigella sativa L.* seeds in mice. *Pharmacolgyonline*. 2: 429–35.
- Isroi. 2010. Biologi rat (*Rattus norvegicus*). [diakses 1 Juni 2016]. Tersedia dari: <http://isroi.wordpress.com>.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., & Trevor, A.J. 2015. *Farmakologi dasar dan klinik*. Edisi 12. Jakarta: EGC.
- Khader, M., & Eckl, P.M. 2014. Thymoquinone: An emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 17(12): 950–57.
- Khairul, M., Sahak, A., Kabir, N., Abbas, G., Draman, S., Hashim, N H., et al. 2016. The role of *Nigella sativa* and its active constituents in learning and memory.
- Khalife, K.H., & Lupidi, G. 2007. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free Radic Res*. 41: 153-61.
- Kiziltan, R., Yilmaz, O., Celik, S., Yildirm, S., Alp, H.H., Aras, A., et all. (2016). Effect of thymoquinone on the healing of left colon anastomosis: an experimental study. *Springer Plus*. 5(1): 956.
- Mashhadian, N.V., Jafari, M.R., Sharghi, N., & Sanati, T. 2013. Protective effects of vitamin c and NAC on the toxicity of rifampin on HepG2 cells. *Iranian*

- Journal of Pharmaceutical Research.* 12(1): 141–46.
- Mescher, A. L. 2012. *Histologi dasar junqueira: Teks & atlas.* Jakarta: EGC.
- Mohamed, A., Afandi, D.M., Garani, O., & Tucci, M. 2005. Thymoquinone inhibites the activation of NF-kappaB in the bain and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biomed Sci Instrum.* 41: 388-93.
- Mollazadeh, H., & Hosseinzadeh, H. 2014. The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 17(12): 958–66.
- Moore, K.L., & Dalley, A.F. 2013. *Anatomi berorientasi klinis.* Jakarta: Erlangga.
- Mousavi, S.H., Tayarani-Najaran, Z., Asghari, M., & Sadeghnia, H.R. 2010. Protective effect of *Nigella sativa* extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 30(4): 591–98.
- Murray, R.K., Granner, D.K., & Rodwell, V.W. 2013. *Biokimia Harper.* Jakarta: EGC.
- Navarro V.J., & Senior J.R. 2006. Drug-related hepatotoxicity. 351: 731-9.
- Perdana, D.C. 2013. Pengaruh ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa L.*) terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi gentamisin. [Skripsi]. Lampug: Universitas Lampung
- Prihatni, D., Parwati, I., Sjahid, I., & Rita, C. 2005. Efek hepatotoksik anti tuberkulosis terhadap kadar aspartate aminotransferase dan alanine aminotranferase serum penderita tuberkulosis paru. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory.* 12(1): 1–5.
- Purnomo, H. 2008. Pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*) sebagai hepatoprotektor pra pemberian parasetamol dosis tinggi tunggal terhadap fungsi hepar tikus putih (*Strain Wistar*). [Thesis]. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Putri, D.K. 2014. Pengaruh pemberian etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana Linn.*) terhadap kadar ureum kreatinin tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley yang diinduksi rifampisin. [Skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.
- Putz, R., & Pabst, R. 2003. *Sobotta.* Edisi 21. Jakarta: EGC.
- Robbins, S.L., Kumar, V., & Cotran S.R. 2007. *Buku ajar patologi Robbins.* Edisi 7. Jakarta: EGC.

- Santhosh, S., Sini, T.K., Anandan, R., & Mathew, P.T. 2006. Effect of chitosan supplementation on antitubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*. 219(1-3): 53–9.
- Saraswati, Basuki, & Soleha. 2014. Influence Of Giving Ethanol Extract Of Mangosteen Peel (*Garcinia Mangostana L.*) To ALT Enzyme Activity In White Malerat (*Rattus Novergicus*) Strain Sprague Dawley Induced Rifampicin. *Juke Unila*. 3(2): 108–115.
- Sayed-Ahmed, M.M., Aleisa, A.M., Al-Rejaie, S.S., Al-Yahya, A.A., Al-Shabanah, O.A., Hafez, M.M., et al. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. 2010. *Oxid Med Cell Longev*. 3: 254-61.
- Seronello, S., Sheikh, M.Y., & Choi, J. 2007. Redox regulation of hepatitis C in nonalcoholic and alcoholic liver. *Free Radic Biol Med*. 43: 869–82.
- Sherwood, L. 2016. *Fisiologi manusia: Dari sel ke sistem*. Jakarta: EGC.
- Shiddiqi, T. 2008. Pengaruh minyak jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap kerusakan histologis ginjal mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi parasetamol [Skripsi]. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Sousa, M., Pozniak, A., & Boffito, M. 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of drug interactions involving rifampicin, rifabutin and antimalarial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(5): 872–878.
- Suk, K.T., & Kim, D.J. 2012. Drug-induced liver injury: Present and future. *Clinical and Molecular Hepatology*. 18(3): 249.
- Sulistri, F., & Radji, M. 2014. Potensi pemanfaatan *Nigella sativa L.* sebagai imunomodulator dan antiinflamasi. 1(2).
- Swamy, A.H.M.V., Kulkarni, R.V, Koti, B.C., Gadad, P.C., Thippeswamy, A.H.M., & Gore, A. 2012. Hepatoprotective effect of cissus quadrangularis stem extract against rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 74(2): 183-87.
- Tasawar, Z., Siraj, Z., Ahmad, N., & Lashari, M.H. 2011. The effects of *Nigella sativa* (*Kalonji*) on lipid profile in patients with stable coronary artery disease in Multan, Pakistan. *Pakistan Journal of Nutrition*. 10(2): 162–67.
- Toole, G., & Toole, S. 1999. *Understanding Biology for Advanced Level*. London: Starney thornes.
- Umar, S., Zargan, J., Umar, K., Ahmad, S., Katiyar, C.K., Khan, H.A. 2012. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by

- thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 197: 40-6.
- Wai, C.T. 2006. Presentation of drug-induced liver injury in Singapore. *Singapore Medical Journal.* 47(2): 116–20.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius.
- Yuhas, Y., Berent, E., & Ashkenazi, S. 2011. Effect of rifampin on production of inflammatory mediators in HepG2 liver epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 55(12): 5541–46.
- Zhao J. 2013. Protective effects of metallothionein on isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS ONE.* 8(8): 720-58.