

# PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTEN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP APOPTOSIS SEL EPITEL BRONKIOLUS DAN APOPTOSIS LIMFOSIT T SALURAN NAFAS BRONCHIOLUS PADA MODEL MENCIT ASMA

Endang Sriwahyuni\*, Centaura Naila\*\*, Imama Khalis Nur Arifah\*\*.

## Abstract

*Airway remodelling refers to the structural changes that occur in the airway wall in asthma. These is irreversible changes to the airway, with damage of bronchiolus epithelium because the airway epithelium undergoes apoptosis as one of its manifestations. Empirically black seed has been known as bronchial asthma therapy for many years ago. The purpose of the research is to test the effect of black seed (*Nigella sativa* L.) extract to apoptosis of bronchiolus epithelium and apoptosis of T lymphocytes the airway bronchial asthma on asthma mouse model. Female mice were used in the experimental laboratory research and allergic mouse model was got by given ovalbumin twice within 3 weeks intraperitoneally and 3 times per week within 6 weeks by inhalation. Black seed extract is given in 3 different dose (0,024 cc/day, 0,048 cc/day and 0,096 cc/day) for 9 weeks. Sample was chosen randomly to share it within 5 group containing 6 mice in every group ; negative control group (without any treatment, n=6), positive control group (sensitized with ovalbumin, n=6), JH1 group (sensitized with ovalbumin and treating with first dose of black seed extract, n=6), JH2 group (sensitized with ovalbumin and treating with second dose of black seed extract, n=6), JH3 group (sensitized with ovalbumin and treating with third dose of black seed extract, n=6). The parametric that is used in this research is the change in the color of the nucleus of bronchiolus epithelium and T lymphocytes the airway bronchial asthma show the occurrence of browning apoptosis. The result shown a significant increase of apoptosis of bronchiolus epithelium on positive control group to compare with negative control group. The apoptosis of bronchiolus epithelium on JH1 shown an increase compare with positive control group. For JH2 and JH3 groups shown a decrease the apoptosis of bronchial epithelium compare with positive control group. And the research indicate that the insignificant aptosis decrease were happen on a group with positive control instead of the group with negative control. Meanwhile, on JH1 group, apoptosis decrease were happening more significantly than the positive control group does, the aptosis increases were happen on JH2 and JH3 group, but its not capable to exceeding the positive control group apoptosis amount The conclusions is the black seed (*Nigella sativa* L.) extract can decrease apoptosis of bronchiolus epithelium on asthma mouse model in the third dose as the best result and the doses of black seed extract that were giving to the experiment mice can not increasing the apoptosis T Lymphocyte, thus requiring further research to figure out the perfect doses to increasing against respiratory tract apoptosis T Lymphocyte.*

**Keyword:** *asthma, black seed, the apoptosis of bronchiolus epithelium, apoptosis limfosit T.*

## Abstrak

*Airway Remodelling merupakan perubahan struktur yang terjadi pada dinding saluran nafas penderita asma, yang bersifat irreversibel, salah satu manifestasinya berupa kerusakan epitel bronkiolus karena mengalami apoptosis. Sebaliknya ketidakseimbangan antara Th1 dan Th2, membuat sitokin proinflamasi akan keluar lebih banyak, hal ini akan menyebabkan terhambatnya apoptosis Limfosit T. Jinten hitam dikenal secara empiris dapat mengobati asma bronkial. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek ekstrak jinten hitam terhadap apoptosis sel epitel dan apoptosis Limfosit T saluran nafas bronkiolus pada model mencit asma dengan memberikan sensitisasi pada hewan coba mencit betina dengan alergen ovalbumin secara intraperitoneal 2 kali selama 3 minggu dan secara inhalasi 3 kali per minggu selama 6 minggu. Ekstrak jinten hitam diberikan dalam 3 dosis (0,024 cc/hari, 0,048 cc/hari, dan 0,096 cc/hari) selama 9 minggu. Sampel dipilih secara random dibagi dalam 5 kelompok terdiri dari 6 ekor mencit, kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kontrol positif (sensitisasi ovalbumin), kelompok JH1 (sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 0,024 cc/hari), kelompok JH2 (dengan sensitisasi ovalbumin dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 0,048 cc/hari), dan kelompok JH3 (sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 0,096 cc/hari). Parameter yang digunakan adalah perubahan warna inti sel yang kecoklatan sel epitel pada bronkiolus dan limfosit T bronkiolus terminalis mencit menunjukkan terjadinya apoptosis. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan apoptosis sel epitel*

\* Laboratorium Fisiologi FKUB.

\*\* Program Studi Pendidikan Dokter FKUB.

bronkiolus yang signifikan pada mencit kelompok kontrol positif bila dibandingkan dengan mencit kelompok kontrol negatif. Kelompok mencit JH1 menunjukkan peningkatan apoptosis dibandingkan kontrol positif. JH2 dan JH3 menunjukkan apoptosis epitel bronkiolus yang semakin berkurang dibandingkan dengan kontrol positif. Pada pengamatan apoptosis Limfosit T sel nafas bronkiolus menunjukkan penurunan apoptosis tidak signifikan pada kontrol positif dibandingkan kontrol negatif. Sementara itu pada kelompok JH1 terjadi penurunan apoptosis limfosit T dibandingkan dengan kontrol positif, sedangkan pada JH2 dan JH3 terjadi peningkatan apoptosis tetapi jumlahnya tidak mampu melebihi dari kelompok kontrol positif. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*) dapat menurunkan apoptosis sel epitel saluran nafas bronkiolus pada model mencit asma dengan hasil yang optimum pada pemberian ekstrak jinten hitam sebesar 0,096 cc/bari, dan ternyata jinten hitam belum mampu meningkatkan apoptosis Limfosit T dengan dosis tersebut sehingga membutuhkan penelitian yang lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang optimum untuk meningkatkan apoptosis Limfosit T bronkiolus asma.

Kata kunci: asma, jinten hitam, apoptosis sel epitel bronkiolus, apoptosis limfosit T

## PENDAHULUAN

Asma menjadi masalah besar di seluruh dunia, hal ini terbukti dengan adanya peningkatan prevalensi dan angka kematian dari waktu ke waktu. Diperkirakan asma diderita oleh 100-150 juta jiwa di seluruh dunia. Permasalahan ini tidak hanya timbul di negara maju namun juga di negara berkembang. Di Amerika setiap tahun sekitar 1,5-2 juta kunjungan ke unit gawat darurat karena serangan asma dan kasus asma akut mencapai 2,5-10% angka kunjungan di pusat kesehatan perkotaan (Barus *dkk.*, 2003).

Asma merupakan penyakit inflamasi kronik pada saluran nafas. Perubahan akibat inflamasi pada penderita asma merupakan dasar kelainan faal paru. Kelainan patologi yang terjadi adalah obstruksi saluran napas, hiperresponsivitas saluran napas, kontraksi otot polos bronkiolus, hipersekresi mukus, keterbatasan aliran udara yang ireversibel, eksaserbasi, asma malam dan analisis gas darah. Perubahan akibat inflamasi ini juga berperan dalam *remodelling* jalan nafas, yaitu suatu proses reparasi saluran respiratorik yang menghasilkan perubahan struktural dan fungsional yang menyimpang pada saluran respiratori (Rahmawati *dkk.*, 2003).

Dalam patogenesis asma, terjadinya apoptosis mungkin juga mempunyai peran penting sehingga menyebabkan proses inflamasi kronis. Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal. Proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi sel yang fisiologis sehingga dengan demikian dapat memelihara fungsi jaringan agar tetap normal (Kresno, 2002). Pada proses inflamasi, apoptosis berfungsi untuk mengendalikan kelebihan sel inflamasi, membatasi kerusakan jaringan, dan meredakan proses inflamasi.

Epitel saluran nafas merupakan target inflamasi dan stimuli fisik pada pasien asma. Kerusakan pada epitel ini sering dijumpai pada penderita asma, bahkan pada gejala asma yang paling ringan. Kerusakan epitel berhubungan langsung dengan hiperreaktivitas saluran nafas pada penderita asma, baik pada penderita asma

ringan maupun penderita asma persisten. Hal ini mendukung bahwa proses inflamasi ringan oleh karena kerusakan epitel sudah mampu menyiapkan proses awal kerusakan mucosa dan terjadinya *remodelling*. Pada penderita asma terjadi pelepasan sel epitel empat kali lebih besar dibandingkan pada orang-orang yang tidak asma setelah dilakukan pengambilan BAL (*Bronchoalveolar Lavage*) dengan teknik *bronchial washing*, yaitu suatu teknik yang dilakukan dengan cara menyemprotkan saluran pernafasan dengan larutan normal saline. Sebagian besar dari sel epitel ini merupakan sel epitel bercilia (White, 2002).

Telah dibuktikan bahwa kerusakan pada epitelium saluran nafas dapat menyebabkan terjadinya proses inflamasi. Kerusakan epitel ini terjadi oleh karena sel epitel saluran nafas mengalami apoptosis. Apoptosis pada sel epitel yang terjadi pada penderita asma dapat disebabkan oleh berbagai keadaan seperti protein tungau, debu rumah maupun bahan-bahan oksidan (White, 2002).

Ditemukan juga adanya antibodi spesifik anti sitokin yang menghambat apoptosis seperti anti-TNF- $\alpha$  dan anti-IL10 pada penderita asma. Terlihat peningkatan infiltrasi limfosit T pada submukosa bronchial, serta terjadi pula peningkatan ekspresi (mRNA dan protein) dari genes suppressor apoptosis Bcl2 (anti apoptosis protein) pada limfosit T dimana Bcl2 anti apoptosis ini akan memblokir rilis dari sitokrom C yang akan mengaktifkan caspase2 lainnya, hal inilah yang menyebabkan terjadinya penurunan apoptosis pada limfosit. (Vignola, *et al.*, 2005). Salah satu Obat herbal yang saat ini menjadi fenomena adalah jinten hitam (*Nigella sativa*). Minyak dari herbanya diyakini bisa mengobati penyakit yang berhubungan dengan sistem pernapasan, saluran pencernaan, gangguan lambung dan liver serta untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Senior, 2007).

Pada minyak jintan hitam terdapat bahan aktif utama yaitu thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ), dan thymol (THY) (Gilani *et al.*, 2004; Gazzar *et al.*, 2006). Thymoquinon ini yang dapat digunakan sebagai anti-inflamasi, TQ dapat

menghambat generasi dari mediator inflamasi, thromboxane B2 dan leukotriene B4 dengan menghambat kedua jalur cyclooxygenase dan 5-lipoxygenase. TQ tidak hanya menghambat respon Th2 dan sitokin tapi juga merangsang respon Th1 dengan menginduksi IFN- $\alpha$  baik invitro maupun invivo. (Gazzar *et al*, 2006).

Penelitian kali ini akan menguji pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella Sativa*) terhadap apoptosis sel epitel bronkiolus dan apoptosis limfosit T saluran nafas bronchiolus pada model mencit asma.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental dimana terdapat intervensi terhadap subyek penelitian. Rancangan eksperimen yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dimana subyek mencit dibagi secara random menjadi lima kelompok, yaitu: kontrol negatif (tanpa perlakuan), kontrol positif (dengan sensitisasi ovalbumin), kelompok JH1 (dengan sensitisasi ovalbumin dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 0,024 cc/hari), kelompok JH2 (dengan sensitisasi ovalbumin dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 0,048 cc/hari), dan kelompok JH3 (dengan sensitisasi ovalbumin dan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 0,096 cc/hari).

Aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) bagi hewan uji dilakukan selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada waktu tujuh hari ini, mencit hanya diberi makan dan minum standar laboratorium secara *ad libitum*.

Sensitisasi awal dilakukan secara intraperitoneal menyuntikkan campuran 10 ig ovalbumin (OVA) + 1 mg Al(OH)<sub>3</sub> yang dilarutkan dalam 0,5 cc normal saline (NaCl 0,9%) pada hari ke-0 dan hari ke-14. Sensitisasi ulangan dilakukan secara inhalasi dengan memberikan ovalbumin (OVA) 1% dalam normal saline (NaCl 0,9%) sebanyak 8 cc per perlakuan dengan menggunakan *nebulizer* OMRON tipe NU-017 selama 20 menit dengan *air flow volume* dan *nebulization volume* pada skala 1. Sensitisasi secara inhalasi tersebut diulang selama 6 minggu sesuai jadwal, yaitu pada hari ke-21, 23, 25, 28, 30, 32, 35, 37, 39, 42, 44, 46, 49, 51, 53, 56, 58, dan 60, pada waktu yang kurang lebih sama pada tiap perlakuan, yaitu antara pukul 09.00 – 11.00 WIB.

Pemberian ekstrak jinten hitam dilakukan setiap hari secara *forced feeding* dengan menggunakan spuit yang pada ujungnya ditumpulkan dengan planina dan dimasukkan melalui mulut mencit. Ekstrak jinten hitam yang diberikan sebanyak 0,024 cc/hari pada kelompok JH1, 0,048 cc/hari pada kelompok JH2 dan 0,096 cc/hari pada kelompok JH3.

Pada mencit yang telah diberi perlakuan selama 9 minggu dilakukan pengambilan organ setelah sebelumnya

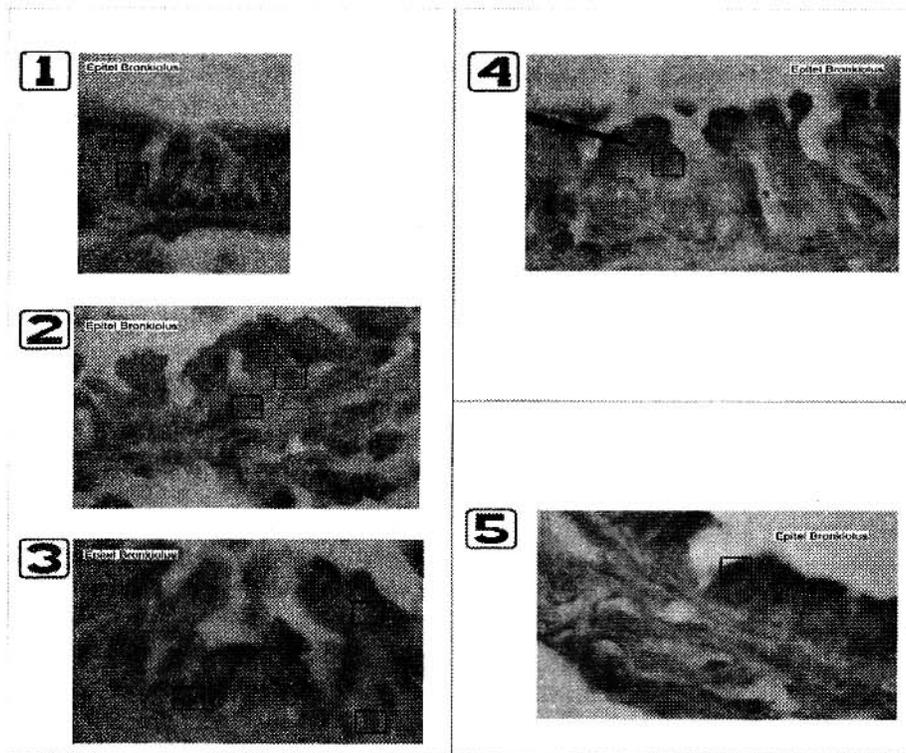
dilakukan anestesi hingga mencit-mencit tersebut mati dengan agen anestesi *ketamin* dan *midazolam*. Organ paru diletakkan di dalam tempat organ dan difiksasi dengan formalin 10%, selanjutnya dibuat sediaan histopatologi.

Sediaan diamati pada sel epitel dan limfosit T bronkiolus mencit dengan indikator perubahan warna inti sel yang kecoklatan menunjukkan terjadinya apoptosis. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x sebanyak 3 lapang pandang untuk setiap sediaan. Untuk dokumentasi dilakukan pemotretan terhadap hasil pengamatan dengan kamera mikroskop Olympus DP71.

Data yang diperoleh sesuai dengan pembagian kelompok dianalisa menggunakan uji statistik dengan metode *one-way ANOVA* (analisa varian satu arah) dan uji *Post Hoc* dengan metode *Tukey* sebagai uji lanjutan. Sedangkan untuk mengetahui korelasi data-data tersebut digunakan uji korelasi *Pearson* dan untuk mengetahui pengaruh peningkatan dosis jinten hitam terhadap jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit dan apoptosis limfosit T digunakan uji regresi.

## HASIL PENELITIAN

Dari gambaran histopatologi bronkiolus mencit yang telah dilakukan pelabelan fragmen DNA didapatkan data kualitatif berupa peningkatan jumlah apoptosis sel epitel pada kelompok kontrol positif (sensitisasi dengan ovalbumin) yang ditunjukkan pada gambar 1.2 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (tanpa sensitisasi ovalbumin) yang ditunjukkan pada gambar 1.1. Sedangkan pada kelompok JH 1 / jinten hitam 1 (sensitisasi dengan ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 0,024 cc/hari) yang ditunjukkan pada gambar 1.3 didapatkan peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang tidak jauh berbeda bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Penurunan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus baru terjadi pada kelompok JH 2 (sensitisasi dengan ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 0,048 cc/hari) yang ditunjukkan pada gambar 1.4 dan kelompok JH 3 (sensitisasi dengan ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 0,096 cc/hari) yaitu pada gambar 1.5.

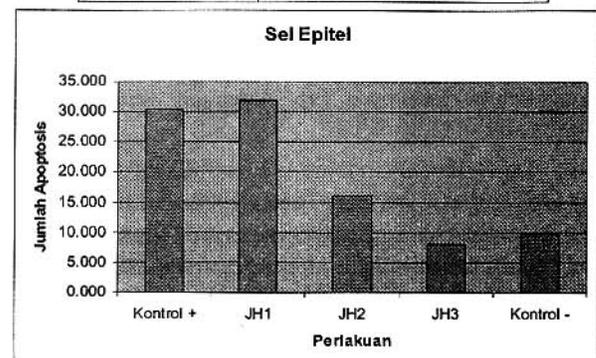


**Gambar 1.** Gambaran histopatologi epitel bronkiolus menciit, pelabelan fragmen DNA; 1: Gambaran epitel bronkiolus menciit pada kelompok kontrol negatif (tanpa sensitisasi ovalbumin, tanpa ekstrak jinten hitam), pelabelan fragmen DNA (TUNEL, 1000x) Tampak sel epitel bronkiolus yang mengalami apoptosis (dalam kotak) Terlihat bahwa jumlah sel epitel yang mangalami apoptosis masih dalam batas normal; 2: Gambaran epitel bronkiolus menciit pada kelompok kontrol positif (dengan sensitisasi ovalbumin, tanpa ekstrak jinten hitam), pelabelan fragmen DNA (TUNEL, 1000x) Tampak bahwa sel epitel bronkiolus yang mengalami apoptosis (dalam kotak) lebih banyak (rerata : 30,333) dibanding kontrol negatif (rerata : 9,667); 3: Gambaran epitel bronkiolus menciit pada kelompok JH1 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 1), pelabelan fragmen DNA (TUNEL, 1000x) Tampak jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang tidak jauh berbeda (rerata : 32,00) dari kelompok kontrol positif (rerata : 30,333); 4: Gambaran epitel bronkiolus menciit pada kelompok JH 2 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 2), pelabelan fragmen DNA (TUNEL, 1000x) Tampak jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus lebih sedikit (rerata : 16,000) bila dibandingkan dengan kelompok JH 1 (rerata :32,000); 5: Gambaran epitel bronkiolus menciit pada kelompok JH3 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 3), pelabelan fragmen DNA (TUNEL, 1000x) Tampak jumlah sel epitel bronkiolus yang mengalami apoptosis lebih sedikit (rerata : 8,000) dibandingkan dengan kelompok JH 2 (rerata : 16,000) dan cenderung mirip dengan kelompok kontrol negatif atau normal.

Untuk mendapatkan data kuantitatif dilakukan penghitungan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus menciit dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dalam 3 lapang pandang. Hasil penghitungan yang didapat berupa rerata apoptosis sel epitel bronkiolus yang ditampilkan pada tabel 1.

**Tabel 1.** Rerata hasil pengujian jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus menciit pada preparat histopatologi dengan pengecatan pelabelan fragmen DNA dalam 3 lapang pandang dengan perbesaran 1000x

Kelompok menciit	Rata-rata
Kontrol (-)	9.667 ± 0.667
Kontrol (+)	30.333 ± 1.783
JH 1	32.000 ± 3.768
JH 2	16.000 ± 1.862
JH 3	8.000 ± 0.775



**Gambar 2.** Grafik rata-rata apoptosis sel epitel bronkiolus menciit

**Keterangan:**

Kontrol (-) : tanpa perlakuan sensitisasi & tanpa pemberian ekstrak jinten hitam

Kontrol (+) : diberikan perlakuan sensitisasi, namun tanpa pemberian ekstrak jinten hitam

JH 1 : diberikan perlakuan sensitisasi & diberikan ekstrak jinten hitam 0,024 cc/hari (dosis 1)

JH 2 : diberikan perlakuan sensitisasi & diberikan ekstrak jinten hitam 0,048 cc/hari (dosis 2)

JH 3 : diberikan perlakuan sensitisasi & diberikan ekstrak jinten hitam 0,096 cc/hari (dosis 3)

Dari grafik di atas tampak adanya perubahan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit pada tiap-tiap kelompok. Pada kelompok kontrol negatif dimana tidak diberikan perlakuan apapun hasil penghitungan rerata apoptosis sel epitel bronkiolus adalah 9.667. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dimana hanya diberikan sensitisasi dengan ovalbumin saja didapatkan peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus dengan hasil rerata sebesar 30.333. Pada kelompok JH 1 (sensitisasi + ekstrak jinten hitam dosis 1) terjadi peningkatan rerata apoptosis sel epitel bronkiolus mencit menjadi 32.000, sedangkan pada kelompok JH 2 (sensitisasi + ekstrak jinten hitam dosis 2) terjadi penurunan hasil rerata sebesar 16.000. Dan terakhir pada kelompok JH 3 (sensitisasi + ekstrak jinten hitam dosis 3) didapatkan hasil rerata sebesar 8.000. Dengan demikian terjadi penurunan rerata jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit pada kelompok dengan sensitisasi menggunakan ovalbumin dan pemberian ekstrak jinten hitam jika dibandingkan dengan kelompok dengan sensitisasi menggunakan ovalbumin namun tanpa pemberian ekstrak jinten hitam.

Selanjutnya dilakukan uji statistik. Karena sebaran data adalah normal dan varians data adalah sama, maka uji *One Way ANOVA* yang dilakukan adalah valid. Pada uji *ANOVA* diperoleh nilai  $p = 0.000$ , artinya terdapat minimal 2 kelompok yang memiliki perbedaan apoptosis sel epitel bronkiolus mencit secara bermakna. Untuk mengetahui pada kelompok manakah terdapat perbedaan yang bermakna, dilakukan uji lanjutan yaitu analisis *Post Hoc* dengan metode *Tukey*.

Hasil analisis *Post Hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif ( $p = 0.000$ ), kelompok kontrol negatif dengan kelompok JH 1 ( $p = 0.000$ ), kelompok kontrol positif dengan kelompok JH 2 ( $p = 0.000$ ), kelompok kontrol positif dengan kelompok JH 3 ( $p = 0.000$ ), kelompok JH 1 dengan kelompok JH 2 ( $p = 0.000$ ) dan kelompok JH 1 dengan kelompok JH 3 ( $p = 0.000$ ). Dengan demikian dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit yang bermakna

pada 6 perbandingan antar kelompok tersebut. Sedangkan pada 4 perbandingan yang lain didapatkan nilai  $p > 0.05$ . Pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok JH 2 didapatkan nilai  $p = 0.235$ , pada kelompok kontrol negatif dengan JH 3 didapatkan nilai  $p = 0.979$ , pada kelompok kontrol positif dengan JH 1 didapatkan nilai  $p = 0.979$  dan pada kelompok JH 2 dengan kelompok JH 3 didapatkan nilai  $p = 0.82$ , maka dapat diambil kesimpulan bahwa pada perbandingan antara kelompok-kelompok tersebut tidak dijumpai perbedaan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit yang bermakna.

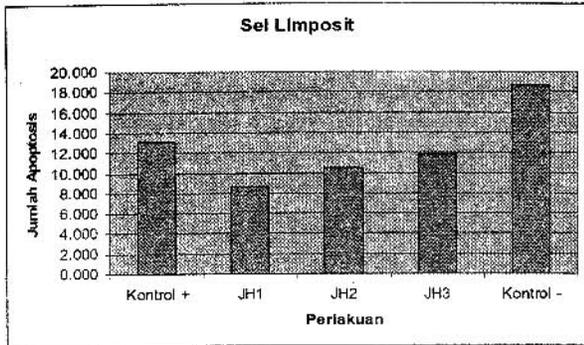
Selanjutnya untuk mencari korelasi antara apoptosis sel epitel dengan pemberian ekstrak jinten hitam pada mencit yang disensitisasi dengan alergen secara kronik, dilakukan uji korelasi *Pearson (bivariate-two tailed)*. Hasil pada *correlations* didapatkan nilai korelasi antara dosis jinten hitam dengan jumlah apoptosis sel epitel sebesar  $-0,929$  dengan nilai signifikansi ( $p$ ) sebesar  $0,242$  yang lebih besar  $0,05$ . Hal ini berarti bahwa terdapat hubungan yang bermakna negatif antara pemberian dosis jinten hitam dengan jumlah apoptosis sel epitel. Artinya peningkatan dosis jinten hitam akan menurunkan jumlah apoptosis sel epitel secara tidak signifikan. Nilai korelasi *Pearson* yang didapat yaitu  $r = -0.929$  menunjukkan arah korelasi yang negatif dengan kekuatan korelasi kuat.

Untuk mengetahui seberapa besar pengaruh peningkatan dosis ekstrak jinten hitam terhadap apoptosis sel epitel bronkiolus mencit dilakukan uji regresi. Hasilnya, didapatkan  $r\ square = 0,862$ , hal ini menunjukkan bahwa  $86,2\%$  variabel jumlah apoptosis sel epitel akan dipengaruhi oleh dosis jinten hitam. Sedangkan sisanya  $13,8\%$  jumlah apoptosis sel epitel akan dipengaruhi oleh variabel-variabel yang lain yang tidak dibahas dalam penelitian ini. Selanjutnya didapatkan persamaan regresi  $Y = 36.00 - 6,190 X$ , dimana  $Y$  adalah jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit dan  $X$  adalah dosis jinten hitam.

Untuk mendapatkan data kuantitatif penghitungan jumlah apoptosis limfosit T bronkiolus mencit dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran  $1000\times$  dalam 3 lapang pandang. Hasil penghitungan yang didapat berupa rerata apoptosis limfosit T bronkiolus yang ditampilkan pada table 2.

Table No. 2

Perlakuan	Rata-rata
Kontrol +	13.167 ± 1.740
JH1	8.667 ± 1.229
JH2	10.500 ± 1.335
JH3	11.833 ± 1.222
Kontrol -	18.667 ± 2.108



**Grafik rata-rata apoptosis sel Limfosit bronkiolus mencit**

Sedangkan Hasil pengamatan data secara kualitatif menunjukkan adanya penurunan jumlah Apoptosis Limfosit T bronkiolus yang nyata pada gambar 4, yaitu kelompok kontrol positif (dengan sensitisasi ovalbumin) bila dibandingkan dengan gambar 3, yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa sensitisasi ovalbumin). Pada gambar 5, yaitu kelompok JH1 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 1) juga didapatkan penurunan jumlah Apoptosis Limfosit T bronkiolus bila dibandingkan dengan gambar 4. Peningkatan jumlah Apoptosis Limfosit T bronkiolus terlihat pada JH2 (sensitisasi dengan ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 2,4 gr/kgBB/hari) yang ditunjukkan pada gambar 6.4 dan kelompok JH3 (sensitisasi dengan ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 4,8 gr/kgBB/hari) pada gambar 7, bila dibandingkan dengan gambar 5, tetapi jumlahnya belum bisa melebihi dari gambar 4.



Gambar 3.

Gambar apoptosis sel Limfosit T bronkiolus mencit pada kelompok kontrol negative (tanpa sensitisasi ovalbumin, tanpa ekstrak jinten hitam), pada pelabelan fragmen DNA, perbesaran 1000x.



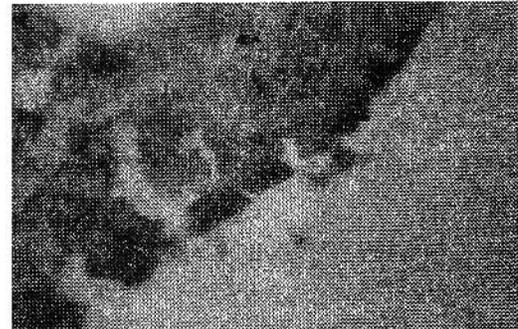
Gambar 4.

Gambar apoptosis sel Limfosit T bronkiolus mencit pada kelompok kontrol positif (dengan sensitisasi ovalbumin, tanpa ekstrak jinten hitam), pada pelabelan fragmen DNA, perbesaran 1000x.



Gambar 5.

Gambar apoptosis sel Limfosit T bronkiolus mencit pada kelompok JH1 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 1), pada pelabelan fragmen DNA, perbesaran 1000x.



Gambar 6

Gambar apoptosis sel limfosit T bronkiolus mencit pada kelompok JH2 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 2), pada pelabelan fragmen DNA, perbesaran 1000x.



Gambar 7.

Gambar apoptosis sel Limfosit T bronkiolus mencit pada kelompok JH3 (dengan sensitisasi ovalbumin dan ekstrak jinten hitam dosis 3), pada pelabelan fragmen DNA, perbesaran 1000x.

Karena sebaran data adalah normal dan varians data adalah sama, maka uji *One Way ANOVA* yang dilakukan adalah valid. Pada uji *ANOVA* diperoleh nilai  $p = 0,000$ , artinya terdapat minimal 2 kelompok yang memiliki perbedaan jumlah apoptosis limfosit T bronkiolus mencit secara bermakna. Selanjutnya untuk mencari korelasi antara peningkatan apoptosis limfosit T dengan pemberian ekstrak jinten hitam pada mencit yang disensitisasi dengan allergen secara kronik, dilakukan uji korelasi *Pearson (bivariate-two tailed)*.

Tabel 3. Uji korelasi jinten hitam terhadap apoptosis sel limposit

Variabel	Uji Korelasi		Keputusan
	Korelasi	Sig	
dosis jinten hitam dengan Jumlah apoptosis sel limposit	0,961	0,179	Ada Hubungan yang tidak signifikan

Berdasarkan Tabel 3. diperoleh nilai korelasi antara dosis jinten hitam dengan jumlah apoptosis sel limposit sebesar 0,961 dengan nilai signifikansi ( $p$ ) sebesar 0,179 yang lebih besar 0,05. Hal ini berarti bahwa terdapat hubungan yang bermakna positif antara pemberian dosis jinten hitam dengan jumlah apoptosis sel limposit. artinya peningkatan dosis jinten hitam akan meningkatkan jumlah apoptosis sel limposit secara tidak signifikan, begitu juga sebaliknya peningkatan dosis jinten hitam akan meningkatkan jumlah apoptosis sel limposit secara tidak signifikan.

Untuk mengetahui pengaruh dosis jinten hitam terhadap jumlah apoptosis sel limposit, dapat diketahui dengan menggunakan analisis bentuk hubungan (regresi), karena dari uji korelasi belum bisa menjelaskan hal tersebut.

Berdasarkan hasil pengujian dengan menggunakan analisis regresi linier sederhana, maka hasil regresi dapat disusun dalam bentuk Tabel 2 sebagai berikut :

Tabel 4. Analisis regresi Linier sederhana

Variabel	Koefisien regresi	Beta	t hitung	nilai p	Keterangan
Konstanta	8,000		10,475	0,061	Tidak Signifikan
Dosis Jinten Hitam	0,833	0,961	3,464	0,179	Tidak Signifikan
R square ( $R^2$ )		= 0,923			
F hitung		= 12,000			
Sig. F		= 0,179			

Berdasarkan Tabel 4. didapatkan Koefisien determinasi yang digunakan untuk menghitung besarnya pengaruh atau kontribusi variabel bebas terhadap variabel terikat. Dari analisis pada Tabel 5.4 diperoleh hasil  $R^2$  (koefisien determinasi) sebesar 0,923. Artinya bahwa 92,3% variabel jumlah apoptosis sel limposit akan dipengaruhi atau dijelaskan oleh dosis jinten hitam. Sedangkan sisanya 7,7% jumlah apoptosis sel limposit akan dipengaruhi oleh variabel-variabel yang lain yang tidak dibahas dalam penelitian ini.

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian baik data kuantitatif maupun data kualitatif didapatkan bahwa terdapat peningkatan jumlah apoptosis sel epitel pada kelompok kontrol positif (sensitisasi dengan ovalbumin) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (tanpa sensitisasi ovalbumin). Sedangkan pada kelompok JH 1 didapatkan peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus bila dibandingkan kelompok kontrol positif. Pada kelompok JH 2 dan JH 3 didapatkan penurunan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Hasil uji statistik menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang signifikan pada mencit kelompok kontrol positif bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Sementara itu, pada kelompok JH 1 terdapat peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit namun tidak berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Sedangkan pada perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok JH 2 ditemukan perbedaan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit yang signifikan, begitu pula antara kelompok kontrol positif dengan kelompok JH 3. Dan pada perbandingan kelompok JH 3 dengan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa korelasi antara pemberian ekstrak jinten hitam dengan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit adalah sangat kuat dan memiliki arah yang negatif yang berarti semakin besar dosis jinten hitam yang diberikan maka peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit semakin sedikit. Sementara itu hasil uji regresi menunjukkan bahwa pengaruh peningkatan dosis ekstrak jinten hitam terhadap jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit sebesar 86,2%.

Pada kelompok kontrol positif, yaitu kelompok mencit dengan pemberian ovalbumin, terdapat peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang signifikan. Hal ini membuktikan bahwa allergen yang diberikan dapat menimbulkan sensitisasi jalan nafas yang menyebabkan meningkatnya jumlah apoptosis sel epitel pada bronkiolus mencit. Peningkatan jumlah apoptosis sel epitel merupakan salah satu penyebab terjadinya deskuamasi sel epitel bronkiolus sehingga akan terjadi pelepasan sel-sel mediator inflamasi oleh sel epitel bronkiolus. Pengeluaran sel-sel mediator inflamasi ini yang menyebabkan terjadinya penyempitan jalan nafas yang terjadi pada keadaan saluran nafas yang tersensitisasi, misalnya pada penyakit asma bronkial.

Pemberian allergen berupa injeksi ovalbumin yang dicampur dengan *aluminum hydroxide* ( $Al(OH)_3$ ) sebagai *adjuvant* secara berulang yang dilanjutkan dengan pemberian ovalbumin per inhalasi dapat menimbulkan

sensitisasi jalan nafas yang menyebabkan peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit. Terjadinya apoptosis sel epitel bronkiolus yang berlebihan akan menyebabkan deskuamasi sel epitel sehingga epitel akan mengeluarkan mediator-mediator inflamasi. Kemudian mediator inflamasi tersebut akan merangsang sel dendritik untuk memproduksi sel TH2 yang akan merangsang produksi IgE. Selain itu sel TH2 juga akan merangsang keluarnya sel-sel inflamasi diantaranya sel mast, basofil, eosinofil, dan makrofag. Dengan teraktifasinya sel inflamasi ini akan menyebabkan pelepasan mediator inflamasi, sitokin dan *growth factor* yang berakibat hiperreaktivitas bronkus. Pelepasan mediator inflamasi akan meningkatkan jumlah sel goblet dan sekresi mukus, bronkokonstriksi, edema dan terjadinya vasodilatasi pembuluh darah (Mangatas dkk, 2006).

Pada kelompok JH 2 dan JH 3 didapatkan penurunan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya disensitisasi ovalbumin saja (kontrol negatif). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian jinten hitam dapat mengurangi jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus pada mencit yang telah disensitisasi menggunakan ovalbumin.

Telah dibuktikan bahwa jinten hitam memiliki berbagai macam kandungan, diantaranya yang menonjol adalah *thymoquinone* dan *nigellone*. Selain itu juga didapatkan kandungan protein, asam amino, lemak, serat, mineral, vitamin, asam folat (Gilani *et al*, 2004). Salah satu manfaat jinten hitam adalah antiinflamasi (Gazzar *et al*, 2006). *Thymoquinone*, sebagai antiinflamasi, akan mencegah proses inflamasi yang terjadi pada mencit dalam keadaan tersensitisasi, sehingga pelepasan mediator inflamasi, sitokin, dan *growth factor* oleh sel-sel inflamasi dapat dicegah (Gazzar *et al*, 2006). Hal ini akan menurunkan terjadinya hiperreaktivitas bronkus dan *airway remodeling*, yang salah satu manifestasinya adalah deskuamasi sel epitel bronkiolus akibat terjadinya apoptosis sel epitel yang berlebihan. Dengan demikian, peningkatan terjadinya apoptosis sel epitel bronkiolus dapat dicegah. Hal ini berarti bahwa pada kelompok mencit JH2 dan JH3, ekstrak jinten hitam terbukti mampu mencegah terjadinya peningkatan apoptosis sel epitel bronkiolus pada mencit yang dipapar allergen secara kronis. Berdasarkan fenomena tersebut, maka hipotesis yang menyatakan bahwa ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat menurunkan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang berlebihan pada model mencit asma dapat diterima.

Dari hasil penelitian didapatkan penurunan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang signifikan pada kelompok mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan diberi jinten hitam dosis 0,096 cc/hari bila dibandingkan dengan kelompok mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan diberi jinten hitam dosis 0,048 cc/hari. Sedangkan pada perbandingan kelompok mencit

yang hanya disensitisasi dengan ovalbumin dengan kelompok mencit yang disensitisasi dengan ovalbumin dan diberi jinten hitam dosis 0,024 cc/hari didapatkan peningkatan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus yang tidak signifikan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis 0,096 cc /hari lebih efektif daripada pemberian jinten hitam (*Nigella Sativa*) pada dosis yang lebih rendah yaitu dosis 0,024 cc/hari dan 0,048 cc/hari. Kesimpulan ini sesuai dengan hasil uji korelasi yang menunjukkan bahwa korelasi antara pemberian ekstrak jinten hitam dan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus mencit adalah sangat kuat dan semakin besar dosis jinten hitam yang diberikan maka jumlah apoptosis sel epitel akan semakin menurun. Juga di dapatkan hasil baik dari data kualitatif maupun kuantitatif yaitu terdapat adanya penurunan jumlah apoptosis sel T bronkiolus yang tidak signifikan pada kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Meskipun tidak signifikan, tetapi tetap terjadi penurunan akibat adanya paparan tersebut, itu artinya telah terjadi penghambatan apoptosis walaupun penghambatannya tidak signifikan. Pemberian allergen berupa ovalbumin dan adjuvan berupa aluminium hydroxide akan masuk pada saluran nafas individu rentan asma, ditangkap dan dipresentasikan oleh antigen presenting cell (APC), khususnya sel dendritik yang berasal dari sumsum tulang dan sel-sel interdigit yang terletak di bawah epitel saluran nafas. Presentasi tersebut mengaktifkan sel T naif, dengan melibatkan HLA (human leukocyte antigen) kelas II, dan selanjutnya terjadi polarisasi ke arah sel Th2. Hasil uji statistik menunjukkan terdapat penurunan jumlah apoptosis limfosit T yg tidak signifikan pula antara JH1 dengan kontrol positif, hal yang sama juga terjadi pada perbandingan antara kelompok JH2 dan JH3. Sedangkan terjadi perbedaan jumlah apoptosis limfosit T yg signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok JH1, JH2 maupun JH3.

Pada kelompok kontrol positif terjadi penurunan jumlah apoptosis yg tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok JH1, padahal dari literatur yg di dapat dikatakan bahwa jinten hitam diharapkan akan membuat apoptosis yg tadinya terhambat dapat terjadi dengan seharusnya dengan kata lain jinten hitam dapat meningkatkan apoptosis yang terhambat (Gezzar *et al*, 2006) dari hal tersebut kemungkinan yg terjadi antara lain jinten hitam tidak mampu menghambat terjadinya proses anti apoptosis ditunjukkan dengan jumlah apoptosis yg justru turun pada JH1, atau dikarenakan telah terjadi kerusakan sel yang banyak, dalam arti kata lain mencit pada kelompok kontrol positif tersebut mengalami asma yang akut dan berat, sehingga pemberian jinten hitam pada kelompok JH1 belum bisa menaikkan jumlah apoptosis. Hasil uji korelasi menunjukkan hasil bahwa terdapat korelasi antara pemberian ekstrak jinten hitam dengan jumlah apoptosis limfosit T brobkiolus mencit adalah sangat kuat dan memiliki arah yang positif

yang berarti pemberian dosis jinten hitam yang semakin besar akan meningkatkan jumlah apoptosis sel limfosit T bronkiolus secara tidak signifikan. Sementara itu hasil uji regresi menunjukkan bahwa pengaruh peningkatan dosis ekstrak jinten hitam terhadap jumlah apoptosis Limfosit T bronkiolus mencit sebesar 92,3%.

Thymoquinone dapat menghambat generasi dari mediator inflamasi, thromboxane B2 dan leukotriene B4 dengan menghambat kedua jalur cyclooxygenase dan 5-lipoxygenase. Thymoquinone tidak hanya menghambat respon Th2 dan sitokin tapi juga merangsang respon Th1 dengan menginduksi IFN- $\alpha$  baik invitro maupun invivo. Dengan adanya peningkatan dari IFN- $\gamma$  maka akan dapat menghambat inflamasi saluran nafas. Jadi, dapat di simpulkan bahwa Thymoquinone dapat menghambat induksi allergen inflamasi dengan cara mengurangi pengeluaran eosinofil, sekresi mucus, sitokin Th2, dan antibody spesifik allergen. (Gazzar et al, 2006)

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah apoptosis antara JH1, JH2, maupun JH3, tetapi jumlahnya tidak bisa melebihi dari jumlah kelompok kontrol positif atau jumlahnya masih di bawah kelompok kontrol positif. Hal ini dapat di simpulkan bahwa pemberian JH1,2 maupun 3 tetap belum bisa menghambat proses anti apoptosis, kerusakan sel masih tinggi sehingga belum bisa terjadi apoptosis atau belum bisa menaikkan angka apoptosis dalam arti lain hasil penelitian ini adalah sinergistik. Kemungkinan hal-hal tersebut dikarenakan beberapa hal seperti, tidak dibedakannya sel TH1 dan TH2, tidak dibedakannya sel CD4+ dan sel CD8+, sehingga bisa saja yang tercatat dan yang terhitung bukanlah sel yang memang di cari, selain itu kemungkinan juga bisa dikarenakan pada saat pengecatan pada sel T bronkiolus tersebut proses apoptosisnya sudah terjadi, sehingga yang tercatat hanya sisa-sisa dari apoptosisnya saja. Pada penelitian Arden, dikatakan bahwa material apoptosis dilepaskan ke sirkulasi setelah 12 jam sejak terjadinya fase akhir dari apoptosis. (Aarden et al, 2002). Karena hal-hal tersebut juga merupakan kelemahan dari penelitian ini untuk itu dibutuhkan penelitian lebih lanjut guna menentukan dosis jinten hitam yg efektif agar apoptosis benar-benar terjadi dan juga metode pengecatan yang sesuai agar tidak melewati batas waktu dari apoptosis itu sendiri. Selain itu kelemahan lain antara lain, pada penelitian ini peneliti langsung melihat angka apoptosis pada proses apoptosisnya bukan pada jalur caspasenya x.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian mengenai efek ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*)

- Terhadap apoptosis sel epitel bronkiolus pada model mencit asma dapat diambil kesimpulan bahwa:
  1. Jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus pada model mencit asma lebih tinggi dibandingkan normal.
  2. Ekstrak jinten hitam memiliki efek menurunkan jumlah apoptosis sel epitel bronkiolus pada model mencit asma.
  3. Dosis optimum ekstrak jinten hitam untuk menurunkan jumlah apoptosis sel epitel pada model mencit asma adalah sebesar 0,096 cc/hari.
- Terhadap apoptosis sel Limfosit T saluran napas bronkiolus pada model mencit asma dapat diambil kesimpulan bahwa Pada pemberian jinten hitam dalam berbagai dosis pada kelompok perlakuan belum bisa meningkatkan apoptosis limfosit T saluran nafas bronkiolus pada model mencit asma. Kemudian Berdasarkan data kuantitatif didapatkan hasil rata-rata jumlah apoptosis bahwa pada Kontrol positif jumlah apoptosis sebesar 13,167 ; pada kontrol negatif sebesar 18,667 ; pada JH1 (sensitisasi+ dosis ekstrak jinten hitam 0,024cc/hari) sebesar 8,667 ; pada JH2 (sensitisasi+ dosis ekstrak jinten hitam 0,048cc/hari) sebesar 10,500 dan pada JH3 (sensitisasi+ dosis ekstrak jinten hitam 0,096cc/hari) sebesar 11,833.

## SARAN

Guna pengembangan lebih lanjut keilmuan mengenai jinten hitam, disarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan pemberian ekstrak jinten hitam dalam kurun waktu tertentu sehingga proses apoptosis yang terjadi mendekati atau sama dengan proses apoptosis pada mencit normal.
2. Karena bahan aktif dari jinten hitam tidak menghambat jalur metabolisme COX secara spesifik, maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak jinten hitam dengan dosis lebih tinggi dan dalam kurun waktu yang lebih lama pada organ lain, seperti gaster.
3. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pemberian dosis ekstrak jinten hitam yang tepat dalam kurun waktu tertentu agar dapat menaikkan jumlah apoptosis Limfosit T.

## DAFTAR PUSTAKA

- Annisa Febrina, 2007. *Nama spesies tumbuhan : Nigella sativa (jinten hitam pabit)*. <http://www.toiusd.multiply.com/journal/item/Nigella-sativa>.
- Awan, 2008. *Nigella sativa (Habbatussauda atau jintan hitam)*. <http://www.healindonesia.wordpress.com>
- Boedina siti, 2001. *Imunology : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium edisi keempat*, Jakarta : Fakultas Kedokteran Indonesia.
- Barnes JP. 2004. The Patophysiology of Asthma. [http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n10/fig\\_tab/nrd1524\\_F1.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n10/fig_tab/nrd1524_F1.html).
- Barus F, Wiyono W, Yunus F. 2003. *Imunoterapi pada Asma Alergi*. <http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/39>.
- Bousquet J, Jeffery P K, Busse W W, Johnson M, Vignola A M. 2000. Asthma from Bronchoconstriction to Airways Inflammations and Remodelling, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 : 1720-1745.
- Cohen L, et al. 2007. Epithelial Cell Proliferation Contributes to Airway Remodeling in Severe Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 : 138-145.
- Despopoulos dan Agamemnon. 2001. *Color Atlas of Physiology*. <http://ilmusehat.com>
- Fraxawant. 2008. Anatomi dan Fisiologi Sistem Pernafasan. <http://fraxawant.wordpress.com/2008/07/16/anatomi-dan-fisiologi-sistem-pernafasan/>.
- Gazzar M E, Mezayen R E, Marecki J C, Nicolls M R, Canastar A, Dreskin S C. 2006. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology* 6: 1135-1142.
- Gewies Andreas. 2003. *Introduction to Apoptosis*. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>.
- Gilani A, Jabeen Q, Khan M. 2004. A Review of Medicinal Uses and Pharmacological Activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (4): 441-451.
- GINA. 2006. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 44-50.
- Guyton AC, Hall JE. 1997. *Pernafasan. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Ed-9*. Jakarta. Hal 608-609.
- Hilman Ibnu. 2008. Mengambil Hikmah Dari Habbatus Sauda. <http://ibnuhilman.wordpress.com/2008/01/18/habbatus-sauda-dan-kegunaannya/>
- Kresno S. 2002. *Disregulasi Apoptosis pada Keganasan*. [http://neuroonkologi.com/articles/Disregulasi\\_apoptosis\\_pada\\_keganasan.pdf](http://neuroonkologi.com/articles/Disregulasi_apoptosis_pada_keganasan.pdf).
- 1Mangatas S M, Hermawan H M, Ketut S. 2006. *Imunologi Asma Bronkial*. *DEXA MEDLA* No. 1, Vol. 19, Januari - Maret 2006: 36-38.
- Ningrum FAS. 2007. *Nigella sativa (Jintan Hitam Pabit)*. <http://toiusd.multiply.com/journal/item/95>.
- Rahmawati I, Yunus F, Wiyono W. 2003. *Patogenesis dan Patofisiologi Asma*. <http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/05>.
- Salem M L. 2005. Immunomodulatory and Therapeutic Properties of *Nigella Sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology* 5: 1749-1770.
- Sari L. 2006. *Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya*. <http://my-curious.com>.
- Saunders W B. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland Edisi 29*. Jakarta. Hal 141
- Senior. 2007. *Jintan Hitam, Penawar Sakit dari Laut Tengah*. <http://cybermed.cbn.net.id>.
- Setiawati L, MS Makmuri. 2003. *Tatalaksana Asma Jangka Panjang pada Anak*. Divisi Pulmonologi Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK Unair, Surabaya.
- Simbar V. 2008. *Obat Asma (1) Agonis Receptor Beta-2 Adrenergik*. [http://victorhealth.blogspot.com/2008/08/Obat-asma\\_1.html](http://victorhealth.blogspot.com/2008/08/Obat-asma_1.html).
- Subandi. 2006. *Sistem Respirasi. Diktat Histologi Q-1*. Laboratorium Anatomi-Histologi FKUB. Malang. Hal 1-17
- Suryaningsih. 2007. *Habbatus Sauda dan Kegunaannya*. <http://suryaningsih.wordpress.com/2007/01/18/habbatus-sauda-dan-kegunaannya/>
- White SR, Dorscheid DR. 2002. Corticosteroid-Induced Apoptosis of Airway Epithelium : A Potential Mechanism for Chronic Airway Epithelial Damage in Asthma. *Chest* 122: 278-284.
- Widjanarko SB. 2008. *Khasiat Jinten Hitam (Nigella sativa (Black Cummin))*. [http://lailanurhayati.multiply.com/journal/item/87/Its\\_All\\_About\\_Nigella\\_sativa\\_Scientific](http://lailanurhayati.multiply.com/journal/item/87/Its_All_About_Nigella_sativa_Scientific).
- Wikipedia. 2007. <http://id.wikipedia.org/wiki/Asma>.