

Pengaruh Pemberian *Thymoquinone* pada Paru Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley* yang Dipapar Asap Rokok Berdasarkan Gambaran Histopatologi

Nadia Eva Zahara¹, Susianti², Agustyas Tjiptaningrum³

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

³Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Tahun 2014 Indonesia menempati urutan ke-4 konsumsi rokok paling tinggi di dunia. Terdapat sekitar 4.800 komponen kimia berbahaya yang telah diidentifikasi terkandung di dalam rokok. Kerusakan paru akibat inflamasi yang disebabkan paparan rokok dapat diperbaiki dengan pemanfaatan obat dari tanaman tradisional. Salah satu tanaman yang dipercaya memiliki efek bagi kesehatan adalah *Nigella sativa* dengan kandungan aktifnya *thymoquinone*. *Thymoquinone* memiliki beberapa mekanisme dalam menghambat kerusakan sel. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian *thymoquinone* terhadap paru tikus yang dipapar asap rokok berdasarkan gambaran histopatologi. Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit yang dibagi kedalam 4 kelompok percobaan. Kelompok 1 (K1) sebagai kontrol normal hanya diberi akuades. Kelompok 2 (K2) sebagai kontrol negatif, diberikan asap rokok sebanyak dua batang/hari. Kelompok 3 (K3) sebagai kontrol positif diberi asap rokok sebanyak dua batang/hari dan selang 2 jam diberi minyak zaitun 0,5 ml/kgBB. Kelompok perlakuan (P) adalah kelompok perlakuan coba dengan asap rokok sebanyak dua batang/hari kemudian selang 2–4 jam dilakukan pemberian *thymoquinone* dosis 5 mg/kgBB. Pemberian asap rokok dan *thymoquinone* diberikan selama 14 hari. Parameter kerusakan paru dilihat dari neutrofil di ruang alveolar dan interstitial dan penebalan septum berdasarkan skoring Bello. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan $p=0,000$ ($p<0,005$) dan uji *Post Hoc LSD* menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok kecuali pada K3 dan P. Berdasarkan hasil tersebut, terdapat pengaruh pemberian *thymoquinone* terhadap paru tikus yang dipapar asap rokok berdasarkan gambaran histopatologi.

Kata kunci: histopatologi paru, rokok, *thymoquinone*

The Effect of *Thymoquinone* on Lung *Sprague Dawley* White Rats (*Rattus norvegicus*) Exposed to Cigarette Smoke Based on Histopathological Feature

Abstract

In 2014 Indonesia ranked 4th in the highest cigarette consumption in the world. There are about 4,800 identified hazardous chemical components contained in cigarettes. Pulmonary damage due to inflammation caused by exposure to cigarettes can be improved by utilizing drugs from traditional plants. One plant that is believed to have an effect on health is *Nigella sativa* L with the active content of *thymoquinone*. *Thymoquinone* has several mechanisms to inhibit cell damage. The aim of the study was to determine the effect of *thymoquinone* on rat lungs exposed to cigarette smoke based on histopathology feature. This study used 24 mice which were divided into 4 experimental groups. Group 1 (K1) as a normal control was only given aquades. Group 2 (K2) as a negative control was given two cigarettes per day. Group 3 (K3) as a positive control was given two cigarettes per day and after 2 hours intervals was given 0.5 ml / kgBB olive oil. The treatment group (P) is a treatment group given with two cigarettes and after intervals of 2-4 hours performed *thymoquinone* 5 mg / kgBB orally. Cigarette smoke and *thymoquinone* given for 14 days. The lung damage parameters were seen from neutrophils in the alveolar, interstitial spaces and septal thickening based on Bello's scoring. One Way Anova test results showed $p = 0,000$ ($p < 0,005$) and Post Hoc LSD test showed significant differences between groups except for K3 and P. Based on these results, there was an effect of giving *thymoquinone* to rat lungs exposed to cigarette smoke based on histopathology feature

Keywords: cigarettes, pulmonary histopathology, *thymoquinone*

Korespondensi: Nadia Eva Zahara | Jalan Bumi Manti 1 Kampung Baru No. 36 | 085366670225 | nadiazhr20@gmail.com

Pendahuluan

Pada tahun 2014, konsumsi rokok mencapai 5,8 triliun batang di seluruh dunia. Indonesia sendiri menempati urutan ke-4 konsumsi rokok paling tinggi di dunia setelah China, Russia, dan Amerika.¹ Identifikasi komponen kimia tembakau dalam batang

rokok telah dilakukan secara intensif selama lebih dari 50 tahun dan diketahui bahwa terdapat sekitar 4.800 komponen kimia di dalamnya yang berbahaya.² Komponen beracun dan bersifat karsinogenik ini merupakan sumber paparan signifikan yang

dapat memediasi munculnya berbagai penyakit pada manusia.³

Ribuan *reactive oxygen species* (ROS) diproduksi oleh rokok yang dibakar. *Reactive oxygen species* yang terkandung dalam fase gas ini dapat bertahan sementara dan menimbulkan efek pada saluran nafas. *Reactive oxygen species* merusak lapisan epitel saluran nafas dengan menginduksi peroksidasi lipid dan komponen sel membran lain, mengaktifasi jalur oksidasi seluler, dan menyebabkan kerusakan DNA.⁴

Paru adalah salah satu organ yang paling mudah terpapar agen kimiawi seperti asap rokok lewat saluran nafas. Kerusakan paru akibat inflamasi yang disebabkan paparan rokok dapat diperbaiki dengan pemanfaatan obat yang berasal dari tanaman tradisional. Penggunaan obat-obatan tradisional di dunia semakin diminati karena efek yang menjanjikan dan minimnya efek samping yang ditimbulkan. Salah satu tanaman yang dipercaya memiliki banyak manfaat bagi kesehatan adalah *Nigella sativa* L. (jintan hitam) yang juga dikenal dengan *black cumin*. Aktivitas biologi *Nigella sativa* berkaitan erat dengan komponen utamanya. Komponen utamanya adalah *thymoquinone*, *p-cyme*, *carvacrol*, *terpineol*, *tan-ethole*, *a sesquiterpene longifolene*. *Thymoquinone* dan turunannya (*dithymoquinone*, *thymohidroquinone*, dan *thymol*) adalah komponen aktif yang diketahui memiliki efek farmakologis paling banyak. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa biji *Nigella sativa* memiliki khasiat untuk terapi asma, inflamasi, bronkitis, dan eksim dengan mempengaruhi pemberi fungsi biologis di tubuh. Hampir seluruh aktivitas biologis ini terkandung di dalam *thymoquinone*.⁵

Thymoquinone berperan dalam menghambat pembentukan mediator inflamasi, *thromboxane B2* dan *leukotrinB4* dengan menarget enzim *cyclooxygenase* dan jalur *5-lipoxygenase* dari metabolisme asam arakidonat. Sitokin proinflamasi dan mediator inflamasi adalah komponen utama dalam proses inflamasi. Inhibisi keduanya dapat mencegah kelanjutan proses inflamasi dan mengurangi kerusakan sel. El-Gazzar melaporkan terdapat inhibisi *lipopolysaccharide-induced interleukin-5* dan produksi *interleukin-13* pada sel yang

mengalami inflamasi dengan menggunakan *thymoquinone*.⁶

Pada sebuah penelitian, *thymoquinone* terbukti dapat menghambat secara kuat *nitric oxide* (NO) dan *tumor necrosis factor* (TNF)- α , *cyclooxygenase* (COX)-2, interleukin (IL)-6, dan IL-1 β pada tikus yang diinduksi lipopolisakarida. *Thymoquinone* juga mencegah terjadinya inflamasi dengan menurunkan level mediator inflamasi yaitu *nuclear factor kappaB* (NF-Kb), dan COX-2, sedangkan efek antiapoptosis dari *thymoquinone* berupa penurunan kaspase 3 yang merupakan ekspresi penanda apoptosis.^{7,8}

Metode

Jenis penelitian ini adalah desain eksperimental murni (*true experimental designs*) laboratorium yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only control group designs*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2018 sampai Desember 2018.

Populasi penelitian ini adalah mencit berumur 8-12 minggu yang diperoleh dari laboratorium Palembang Tikus Center (PTC). Sampel penelitian sebanyak 24 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 4 kelompok, sesuai dengan rumus Frederer. Perhitungan sampel *drop out* dilakukan untuk mengantisipasi terjadinya mencit yang mati sehingga sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 6 ekor. Tikus sebanyak 24 ekor, dikelompokkan dalam 4 kelompok. Kelompok 1 (K1) sebagai kontrol normal hanya diberi akuades. Kelompok 2 (K2) sebagai kontrol negatif, diberikan asap rokok sebanyak dua batang/hari. Kelompok 3 (K3) sebagai kontrol positif diberi asap rokok sebanyak dua batang/hari dan selang 2 jam diberi minyak zaitun 0,5 ml/kgBB. Kelompok perlakuan (P) adalah kelompok perlakuan coba dengan asap rokok sebanyak dua batang/hari kemudian selang 2–4 jam dilakukan pemberian *thymoquinone* dosis 5 mg/kgBB. Pemberian asap rokok dan *thymoquinone* diberikan selama 14 hari.

Definisi operasional variabel penelitian ini yaitu *Thymoquinone* sintesis yang dibeli dari perusahaan kimia dengan dosis 5mg/kgBB dan gambaran histologis paru dan *thymoquinone*. Gambaran histologis paru yaitu gambaran kerusakan paru tikus mencit dilihat dengan

melakukan pengamatan pada sediaan histologis dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x pada setiap lapang pandang. Parameter kerusakan didasarkan pada neutrofil di ruang alveolar, neutrofil di ruang interstitial, penebalan septum alveolar dengan sistem skoring yang disajikan dalam Tabel 1. Adapun skor akhir dihitung dengan rumus $[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) / (\text{jumlah lapang pandang} \times 100)]$.⁹

Tabel 1. Skoring Kerusakan Paru

Parameter		Skor per lapang pandang		
		0	1	2
a)	Neutrofil di ruang alveolar	Tidak ada	1-5	>5
b)	Neutrofil di ruang interstitial	Tidak ada	1-5	>5
c)	Penebalan septum alveolar	<2x	2x-4x	>4x

Neutrofil di ruang alveolar dengan skoring 1) 0 jika tidak ada neutrofil yang ditemukan per lapang pandang 2) Skor 1 jika ditemukan 1-5 neutrofil per lapang pandang 3) Skor 2 jika lebih dari 5 neutrofil per lapang pandang Neutrofil di ruang interstitial 1) Skor 0 jika tidak ada neutrofil yang ditemukan per lapang pandang 2) Skor 1 jika ditemukan 1-5 neutrofil per lapang pandang 3) Skor 2 : lebih dari 5 neutrofil per lapang pandang. Penebalan septum alveolar 1) Skor 0 jika penebalan kurang dari dua kali lipat tebal septum normal 2) Skor 1 jika penebalan kurang 2-4 kali lipat tebal septum normal 3) Skor 2 : penebalan lebih dari 4 kali lipat tebal septum normal.⁹

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histologi dibawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan *software* analisis statistik. Hasil penelitian dianalisis untuk melihat distribusi data secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-wilk*. Setelah dilakukan uji, didapatkan data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan metode uji parametrik *One Way ANOVA*. Dan selanjutnya dilanjutkan uji Post Hoc LSD untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok.

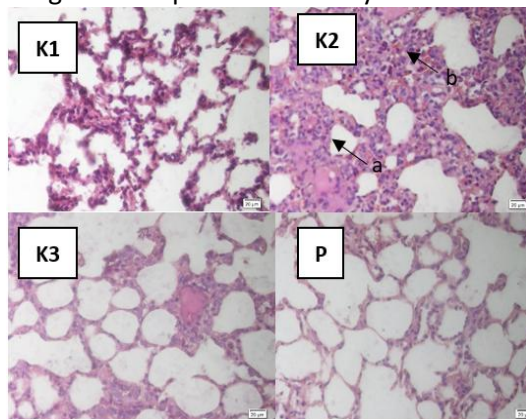
Hasil

Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 28 ekor tikus (*Rattus Novergicus*) jantan galur *Sprague dawley* yang berumur 10-16 minggu. Subjek penelitian dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus dengan 1 ekor tikus cadangan. Penelitian dilakukan selama 14 hari, dengan adaptasi selama 7 hari. Terdapat 4 tikus yang mati selama penelitian pada masing-masing kelompok sehingga memenuhi kriteria eksklusi. Subjek yang mati tersebut merupakan subjek cadangan sehingga subjek minimal tiap kelompok masih terpenuhi.

Berdasarkan penelitian yang dilaksanakan selama 14 hari data hasil penelitian yaitu berupa data rasional mengenai jumlah kerusakan yang terjadi pada gambaran histologis paru tikus dengan menggunakan parameter berupa adanya neutrofil alveolar, neutrofil interstitial dan penebalan septum. Gambaran histopatologi paru tikus pada setiap kelompok penelitian disajikan dalam Gambar 1.

Kelompok K1 adalah kelompok negatif yaitu subjek hanya diberikan aquades selama penelitian. Pada gambaran histologi dilihat tidak terjadi kerusakan paru, sel-sel epitel alveoli berbentuk *squamous simplex* dan tidak mengalami kerusakan berupa hipertropi, hiperplasia ataupun inflamasi. Pada dua lapang pandang di tikus yang berbeda tampak sel radang akut dan penebalan lumen dalam jumlah sangat sedikit. Kelompok K2 yang hanya diberikan asap rokok tanpa diberikan minyak zaitun maupun *thymoquinone* menunjukkan kerusakan yang paling tinggi. Gambaran histopatologi menunjukkan peningkatan jumlah neutrofil interstitial, neutrofil di ruang alveolar (a) dan penebalan septum (b) yang sangat signifikan pada alveolus paru tikus putih. Gambaran destruksi septum juga terlihat pada beberapa lapang pandang. Kelompok K3 yang diberikan asap rokok dan minyak zaitun menunjukkan kerusakan gambaran histopatologi paru minimal. Tidak ditemukan peningkatan jumlah neutrofil interstitial, neutrofil di ruang alveolar dan penebalan septum yang sangat signifikan pada alveolus paru tikus putih. Kelompok P yang diberikan asap rokok dan *thymoquinone* yang dilarutkan dalam minyak zaitu menunjukkan hasil

kerusakan histopatologi minimal yang sama dengan kelompok kontrol minyak zaitun.



Gambar 1. Gambaran histopatologi paru tikus

Keterangan : (a) Penebalan Septum (b) Neutrofil

Pada analisis gambaran histopatologi paru didapatkan uji deskriptif dari skor kerusakan paru pada masing-masing kelompok. Pada K1 didapatkan rerata sebesar 0,023, kelompok kontrol negatif K2 sebesar 0,36, K3 sebesar 0,167 dan P sebesar 0,167.

Data ini kemudian diolah dengan menggunakan program statistik. Seluruh data diuji normalitasnya dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel pada penelitian ini adalah <50. Setelah dilakukan uji normalitas, didapatkan hasil seperti pada tabel Berdasarkan hasil uji normalitas didapatkan data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas *Levene* dan didapatkan hasil bahwa data homogen. Uji selanjutnya yang dilakukan adalah uji hipotesis *One Way Anova* yang menunjukkan hasil bahwa $p=0,000$ ($p<0,005$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian *thymoquinone* terhadap paru tikus putih yang dipapar asap rokok berdasarkan gambaran histopatologi. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Least Significance Different* (LSD) untuk menilai perbedaan pada masing-masing kelompok. Hasil uji *Post Hoc LSD* antar kelompok perlakuan disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Uji Post Hoc LSD

Variabel	K1	K2	K3	P
K1	-	0.000*	0.000*	0.000*
K2	0.000*	-	0.000*	0.000*
K3	0.000*	0.000*	-	0.527
P	0.000*	0.000*	0.527	-

Keterangan :

* : Terdapat perbedaan signifikan

Pada pengujian dengan uji *post-hoc test* dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0,000 antara kelompok kontrol positif (K1) dengan kelompok kontrol negatif (K2), kelompok K1 dengan kelompok K3, kelompok K1 dengan P. Sementara itu, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara K3 dengan P dengan nilai signifikansi 0,527.

Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, subjek penelitian pada kelompok kontrol negatif (K1) yang hanya diberikan aquades menunjukkan gambaran histologi yang masih baik. Adanya neutrofil dan penebalan septum ditemukan dalam jumlah yang sangat sedikit di beberapa subjek pada kelompok K1.

Kelompok K2 menunjukkan penebalan yang jelas di jaringan dinding alveolus, beberapa alveolus kolaps, dan terdapat sel neutrofil pada alveolus. Kerusakan struktur ini dapat disebabkan oleh terjadinya stress oksidatif akibat paparan ROS yang berlebihan dari asap rokok. Asap rokok mengandung banyak ROS dan komponen organik seperti *superoxide* dan *nitrit oxide*. Menghirup asap rokok juga dapat mengaktifasi beberapa mekanisme endogen seperti akumulasi neutrofil dan makrofag yang akan meningkatkan kerusakan paru.¹⁰

Reactive oxygen species (ROS) sendiri diproduksi melalui metabolisme seluler maupun faktor lingkungan, seperti polusi udara, asap rokok. *Reactive oxygen species* merupakan molekul yang sangat mudah bereaksi dengan beberapa makromolekul dalam sel, seperti karbohidrat, protein, asam nukleat, lipid, dan protein. *Reactive oxygen species* juga mempengaruhi ekspresi gen melalui mekanisme *upregulation* dari *redox-sensitive transcription factors* dan perubahan kromatin melalui peningkatan asetilasi histon.¹⁰

Reactive oxygen species merusak sel epitel dengan menginduksi peroksidasi lipid dan komponen membran sel lainnya serta menyebabkan kerusakan DNA. *Reactive oxygen species* juga mengaktifkan kaskade sinyal intraseluler sel epitel yang mengaktifasi gen inflamasi seperti *interleukin-8* dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α). Sekresi dari

mediator inflamasi ini meningkatkan rekrutmen sel peradangan.⁴

Sel yang banyak berperan dalam proses peradangan adalah makrofag alveolar (AMs). Paparan rokok yang mengandung ROS memicu pengaktifan makrofag alveolar yang akan memproduksi sitokin pro-inflamasi yang mengaktifkan sel lain, dan kemokin yang menarik neutrofil dan sel T limfosit yang merupakan faktor paling menonjol dalam inflamasi. Adapun sitokin pro-inflamasi yang berperan seperti *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-8*. Makrofag alveolar juga merupakan sumber utama terjadinya penurunan protease elastin yang mendorong sebagian besar kerusakan septum. Produksi oksidan terkait inflamasi oleh makrofag alveolar juga berkontribusi dalam degradasi septum.¹¹

Kelompok K3 yang diberi minyak zaitun 0,5 ml sebagai pembanding kelompok perlakuan *thymoquinone* menunjukkan gambaran histopatologi dengan kerusakan minimal. Adapun pemberian minyak zaitun pada kelompok kontrol adalah untuk mengetahui adanya pengaruh interaksi *thymoquinone* dan minyak zaitun sebagai dua zat antioksidan pada hasil penelitian *Thymoquinone* sendiri merupakan senyawa yang bersifat lipofilik sehingga perlu dilarutkan dalam minyak zaitun. Minyak zaitun yang diberikan selama penelitian berjenis *extra virgin olive oil* dengan kandungan fenol yang tinggi. Kuantitas dan kualitas polifenol dalam minyak zaitun terkait erat dengan proses penggilingan zaitun dan pengolahan lebih lanjut, sehingga *extra virgin olive oil* memiliki jumlah polifenol yang jauh lebih tinggi daripada *refined olive oil*. Hal ini karena *refined olive oil* sudah melalui proses penyaringan sehingga mengurangi kandungan antioksidan di dalamnya.¹²

Pada penelitian Meilina, pemberian *extra virgin olive oil* (EVOO) dengan dosis oral 1cc (1g/kgbb) menurunkan kadar MDA pada tikus jantan yang dipapar asap rokok selama 14 hari namun tidak sampai batas normal. Penelitian lain menunjukkan bahwa pada dosis 0,125, 0,25, 0,5 ml/kgBB *extra virgin oil* menunjukkan efek antiinflamasi dengan penghambatan pelepasan enzim siklooksigenase yang terlibat dalam sintesis prostaglandin.^{13,14}

Manfaat dari mengonsumsi minyak zaitun untuk kesehatan manusia sudah banyak diteliti terutama berkaitan dengan komposisi asam lemak dan komponen minor lain yang terkandung didalamnya seperti fitosterol, tokoferols dan fenol. Fenol yang terkandung dalam minyak zaitun memiliki efek anti inflamasi, antioksidan.¹⁵

Pada penelitian efek anti-inflamasi polifenol minyak zaitun pada hewan arthritis menunjukkan bahwa minyak zaitun dapat mengurangi jumlah sitokin yang mendorong produksi mediator inflamasi. Sitokin pro inflamasi nantinya akan menarik sitokin, kemokin, dan eicosanoid sebagai respon inflamasi. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa ekstrak polifenol dari *extra virgin oil* (EVOO) dapat mengurangi kadar *prostaglandin E2* (PGE2) yang akan berkaitan dengan *down-regulation* COX-2 dan ekspresi mPGES-1 pada sendi. Penghambatan produksi sitokin proinflamasi oleh ekstrak polifenol minyak zaitun ini akan menyebabkan pengurangan respon inflamasi dan kerusakan jaringan.¹⁶

Pada kelompok perlakuan yang dipapar asap rokok dan diberikan *thymoquinone* yang dilarutkan dalam minyak zaitun menunjukkan gambaran histopatologis dengan kerusakan yang minimal. Hal ini disebabkan karena ROS yang berasal dari asap rokok direduksi dan dicegah pembentukannya dengan *thymoquinone*. Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa *thymoquinone* mampu menghambat kerusakan saluran pernafasan akibat paparan rokok. ditimbulkan oleh ROS.¹⁷

Penelitian El Gazzar *et al.* (2006) membuktikan bahwa *thymoquinone* menurunkan peradangan paru pada model tikus alergi asma dengan menurunkan sitokin T helper 2 (Th-2) dan infiltrasi sel inflamasi di paru. Sitokin-sitokin Th-2, termasuk *interleukin-4*, *interleukinL-5*, dan *interleukinL-13*, telah terbukti memainkan peran penting dalam patogenesis inflamasi saluran napas baik pada hewan coba maupun pada manusia. Sitokin diproduksi oleh banyak tipe sel yang ada ditemukan di paru, termasuk sel T, sel mast, makrofag, dan sel epitel.⁶

Simpulan

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian *thymoquinone* terhadap Paru Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley* yang dipapar asap rokok berdasarkan gambaran histopatologi

Daftar Pustaka

1. Drope J, Eriksen M, Schlunger N, Farhad I, Mackay J. The tobacco atlas fifth edition. USA: American Cancer Society : 2014
2. Tirtosastro S dan Murdiyati AS . Kandungan kimia tembakau dan rokok. Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri. 2010 ; 2(1) : 33–43.
3. Talhout R, Schulz T, Flore E, Benthem JV, Wester P, Opperhuizen . Hazardous compounds in tobacco smoke. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2011 ; 8(2) : 613–28
4. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation. Journal of Dental Research. 2012 ; 91(2): 142–9
5. Sriwahyuni E, Faradina RQ, Anita YK. Black Seed (*Nigella Sativa*) Extract prevent the thickening of bronchus and increase the circumference of bronchial lumen in asthma model mice. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2010 ; 26(1) : 37–42
6. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of *thymoquinone* in mouse model of allergic lung inflammation. International immunopharmacology. 2006 ; 6 (7) : 1135–42
7. Chiu CW, Kumar AP, Sethi G, Huat K, Tan B. *Thymoquinone* : potential cure for Inflammatory disorders and cancer. Biochemical Pharmacology. 2012 ; 83(4) : 443–51.
8. Hossen MJ, Yang WS, Kim D, Ravinthan A, Kim JH dan Cho JY. *Thymoquinone* : An IRAK1 inhibitor with in vivo and in vitro anti- inflammatory activities. Sci Rep. 2017; Vol 7 : 1–12.
9. Bello MG, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS *et al*. An official American Thoracic Society workshop report : features and measurements of experimental acute lung Injury in nimals. America Journal Respiratory Cell Molecular Biology. 2011 ; Vol 44. : 725–38
10. Birben E, Sahiner UM ,Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense . World Allergy Organization Journal. Januari 2012. : 1-19
11. Balhara J, Gounni As. The Alveolar macrophage in asthma a double edged Sword. Mucosal Immunology. 2012 ; 5 (6) : 605-9
12. Debicka MG, Przychodzen P, Cappello F, Jankowska AK, Gammazza AM, Knap N *et al*. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. International Journal of Molecular Science. 2018;19 (547) : 1-13
13. Meiliana. *Extra virgin olive oil* menurunkan kadar MDA (Malondialdehyde) pada tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *wistar* yang dipapar asap rokok. Intisari Sains Medis. 2018 ; 8 (2): 97-101
14. Fezai M,1 Senovilla L, Jemma M, Attia MB. Analgesic, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Extra Virgin Olive Oil. Journal of Lipids. 2013. : 1-6
15. Balamash KS, Alkreathy HM, Al Gahdali EH, Khoja SO, Ahmad A. Comparative biochemical and histopathological studies on the efficacy of metformin and virgin olive oil against Streptozotocin- Induced diabetes in Sprague-Dawley Rats. Journal of Diabetes Research. 2018 : 1-10
16. Rosillo MA, Alcaraza MJ, Hidalgo MS, Ferrandiz ML, Fernandez-Bolanos JG, Alarcon-de-la-Lastra C. Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. Journal of Nutritional Biochemistry. 2014 ; 25 : 1275–81.
17. Solati Z, Baharin BS, Bagheri H. Antioxidant property, *thymoquinone* content and chemical characteristics of different extracts from *Nigella sativa* L. seeds. J Am Oil Chem Soc . 2014 ; 91(2) : 295-300