



**DESKRIPSI**

**FORMULA EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES  
INFLAMASI KONJUNGTIVA DAN KORNEA (INTERLEUKIN 1 / IL1 DAN MATRIX  
MATALLOPROTEINASE 9 / MMP-9) DAN PENINGKAT PROSES EPITELISASI KORNEA**

**5 Bidang Teknik Invensi**

Invensi berkaitan Formula ramuan terapi yang dipergunakan untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan peningkat proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR.

Invensi ini mulai dari Formula, bahan, teknik pembuatan sebagai satu kesatuan dengan fungsinya sebagai ramuan untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan peningkat proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR.

Invensi ini digunakan untuk pembuatan jamu atau obat terapi untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan peningkat proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR.

**Latar Belakang Invensi**

Kondisi status kesehatan manusia di dunia pada tahun 2012 semakin meningkat, sehingga secara tidak langsung akan meningkatkan angka harapan hidup. Dengan semakin meningkatnya angka harapan hidup ini maka jumlah wanita yang mengalami menopause akan semakin meningkat. Sehingga gangguan yang berhubungan dengan kondisi menopause (terjadi penurunan kadar estrogen) akan semakin meningkat.

## DESKRIPSI

### **FORMULA EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES INFLAMASI KONJUNGTIVA DAN KORNEA (INTERLEUKIN 1 / IL1 DAN MATRIX MATALLOPROTEINASE 9 / MMP-9) DAN PROSES EPITELISASI KORNEA**

#### **5 Bidang Teknik Invensi**

Invensi berkaitan Formula ramuan terapi yang dipergunakan untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR.

Invensi ini mulai dari Formula, bahan, teknik pembuatan sebagai satu kesatuan dengan fungsinya sebagai ramuan untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR.

Invensi ini digunakan untuk pembuatan jamu atau obat terapi untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR.

#### **Latar Belakang Invensi**

Kondisi status kesehatan manusia di dunia pada tahun 2012 semakin meningkat, sehingga secara tidak langsung akan meningkatkan angka harapan hidup. Dengan semakin meningkatnya angka harapan hidup ini maka jumlah wanita yang mengalami menopause akan semakin meningkat. Sehingga gangguan yang berhubungan dengan kondisi menopause (terjadi penurunan kadar estrogen) akan semakin meningkat.

Berbagai kelainan yang terjadi pada wanita menopause mendorong para peneliti mencoba mencari berbagai terapi untuk mencari sumber estrogen dari luar tubuh (estrogen eksogen) sebagai pengganti estrogen endogen yang relatif aman. Beberapa senyawa yang berasal dari tumbuh-tumbuhan diketahui mempunyai sifat estrogenik. Senyawa tersebut adalah flavon, isoflavon dan derivat kumestan. (Tanu 2005).

Jintan hitam (*N. sativa*) adalah rempah-rempah yang dapat digunakan sebagai tanaman obat dan pengawet makanan. Tanaman ini adalah tanaman herba yang banyak tumbuh di daerah Mediterania. Baik minyak maupun biji *N. sativa* menunjukkan potensi sebagai bahan pengobatan dalam obat-obatan tradisional. (Randhawa, 2008).

*N. sativa* memiliki senyawa flavinoid dan tanaman yang satu rumpun dengan *N. sativa* yaitu *N. damascena* diketahui memiliki efek estrogenik yang tinggi. (Malhotra, 2004). *N. sativa* memiliki banyak efek. Efek *N. sativa* yang telah diteliti meliputi efek antioxidant, anti diabetic, anti kanker, antimikroba, gastro protektif, efek pada sistem syaraf pusat, dan efek anti inflamasi. Saat ini penelitian mengenai efek anti inflamasi di mata masih belum mendapat banyak perhatian. (Ilaiyaraja, 2010).

Dikenal dengan berbagai nama, diantaranya black seed, black caraway, natura seed, jintan hitam (bahasa Indonesia), black cumin, *nigella sativa*, kaluduru, Al Habba Al Sauda atau Al Habba Al Barokah dalam bahasa Arab, temu ireng (bahasa Jawa) dan lain-lain. (Wikipedia; Randhawa, 2008). Digunakan sebagai herbal pengobatan sejak 2000-3000 tahun sebelum Masehi dan tercatat dalam banyak literatur kuno mengenai ahli pengobatan terdahulu seperti

Ibnu Sina (980 - 1037 M), dan Al-Biruni (973-1048 M), Al-Antiki, Ibnu Qayyim dan Al-Baghdadi. Ibnu Sina adalah peneliti jenius dari Timur Tengah di bidang pengobatan yang namanya tercatat di semua buku sejarah pengobatan timur  
5 maupun barat, hidup antara 980 - 1037 M, telah meneliti berbagai manfaat Habbatussauda untuk kesehatan dan pengobatan. Ahli pengobatan Yunani kuno, Dioscoredes, pada abad pertama Masehi juga telah mencatat manfaat habbatussauda untuk mengobati sakit kepala dan saluran  
10 pernafasan. (Wikipedia,2011)

Senyawa aktif yang terkandung didalam N. sativa diantaranya adalah Nigellisine, nigellidine, nigellimine-N-oksida, thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinon, nigellone, thymol, arvacrol, oxy-coumarin, 6-  
15 methoxycoumarin, dan 7-hydroxy-coumarin, alpha-hedrin, steryl-glucoside, selain itu juga mengandung flavinoids, tannins, asam amino esensial, asam askorbat, besi dan kalsium (Randhawa 2008).

Selain itu berdasarkan analisis farmakologi diketahui  
20 bahwa ekstrak biji N. sativa memiliki aktivitas yang sangat beragam diantaranya adalah sebagai stimulan peningkat imunitas tubuh, stimulan anti-diabetes, anti-hipertensi, anti inflamasi, aktivitas antimikroba, dan antitumor. Mayoritas aktivitas tersebut disebabkan karena kandungan  
25 quinone yang ada di dalam biji tersebut (Mbarek et al., 2007). Menurut Sharma et al. (2009) biji jintan hitam merangsang pembentukan sumsum tulang dan sel sel antibodi, melindungi tubuh terhadap berbagai virus, menghancurkan sel tumor dan menghambat terjadinya infeksi.

30 Individu yang mengalami penurunan kadar estrogen (masa menopause) memiliki resiko mengalami inflamasi pada

konjungtiva dan korneanya, berkaitan dengan keberadaan reseptor estrogen dan androgen pada kelenjar lacrimal dan meibomian mata. Keadaan tersebut akan menimbulkan dry eye syndrome (DES) atau sindroma mata kering (SMK). (Foster, 5 2012)

Sindrom mata kering diklasifikasikan menjadi 2 kelompok, yaitu tipe defisiensi air mata, dimana terjadi defisiensi sekresi akuos, dan tipe evaporative, yang disebabkan karena evaporasi air mata yang berlebihan. Tipe 10 defisiensi air mata dibagi lagi menjadi 2 kelompok, yaitu sjogren syndrome-associated keratoconjungttivitis sicca (SS KCS) yang berubungan dengan penyakit autoimun dan non-sjogren keratoconjungttivitis sicca (NS KCS) yang tidak berhubungan dengan penyakit autoimun. Tipe NS KCS merupakan 15 tipe terbanyak, meliputi 2/3 bentuk SMK. Masing-masing tipe SMK memiliki gambaran umum yang sama, yaitu adanya gejala yang khas, kerusakan permukaan bola mata, penurunan stabilitas air mata, dan hiperosmolaritas air mata. Meningkatnya evaporasi akibat gangguan pada lapisan lipid 20 merupakan penyebab terbanyak terjadinya hiperosmolaritas lapisan air mata. hiperosmolaritas menyebabkan terjadinya stress proinflamasi pada permukaan bola mata.(Nerayanan, 2006)

Berbagai agen cytokine proinflamasi pada SMK yang 25 disekresikan oleh makrofag akan menimbulkan destruksi sel konjungtiva dan kornea, salah satu cytokine penting yang diekspresikan adalah interleukin 1 (IL-1). (Foster, 2012) Perubahan lain yang terjadi adalah peningkatan konsentrasi matrix matalloproteinase 9 (MMP-9) yang disekresikan oleh 30 sel epitel kornea sebagai reaksi terhadap pelepasan cytokine. MMP-9 akan menimbulkan kerusakan membrane

basement epitel kornea dan protein tight junction yang mempertahankan fungsi barrier epitel kornea. (Wong, 2002) Inflamasi pada epitel kornea ini juga menimbulkan hilangnya integritas epitel kornea yang membutuhkan proses epitelisasi dalam perbaikannya. Epidermal growth factor (EGF) merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap terjadinya interaksi seluler dalam proses epitelisasi kornea. EGF didapatkan pada berbagai jaringan dan identifikasinya dapat dilakukan melalui pengenalan reseptor EGF (EGFR atau erbB) yang terdapat pada permukaan sel. (Zhou, 2002).

Dosis yang tepat untuk manusia diestimasi dari komponen aktifnya (thymoquinon = TMQ)) dan berdasarkan hasil penelitian pada tikus untuk mencari dosis efektif. Dengan menggunakan NOVEL (No observed adverse effect level) dan HED (human equivalent dose) diperoleh dosis TMQ 0,6 mg/kg/hari peroral . Pada percobaan tikus dengan rematoid arthritis diperoleh dosis TMQ 2.5 - 5 mg/kg/hr. (Valizadeh, 2009) Pada pengobatan tradisional Indian 10 - 20 grain biji Nigella akan memperbaiki keadaan dismenore dan pada dosis yang lebih besar dapat menginduksi abortus. (Malhotra, 2004)

Apapun penyebab awal SMK, kekeringan kronis yang terjadi pada permukaan bola mata menyebabkan reaksi inflamasi dan kerusakan bertahap dari kelenjar lakrimalis, epitel konjungtiva, dan epitel kornea. Inflamasi merupakan mekanisme kunci pada kelainan permukaan bola mata, baik sebagai penyebab maupun akibat dari kerusakan sel yang terjadi. Kerusakan epitel permukaan bola mata sedikit saja cukup untuk menimbulkan SMK yang signifikan. SMK berhubungan dengan berbagai derajat inflamasi permukaan

bola mata yang bermanifestasi sebagai mata merah. Hal pertama yang menyebabkan terjadinya inflamasi adalah adanya stimulus, yang menginduksi munculnya ekspresi sitokin proinflamasi dan berbagai mediator lainnya, yang secara keseluruhan merupakan sinyal bagi host bahwa telah terjadi perubahan fisiologis normal dan lingkungan mikro. Sebagai respon terhadap sinyal tersebut, sel jaringan local akan mengaktifasi jalur transduksi sinyal yang meningkatkan ekspresi gen sitokin atau gen reseptor sitokin. Dari penelitian Solomon et al, 2001 didapatkan jumlah mRNA yang mengkode beberapa sitokin proinflamasi, termasuk IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ , meningkat pada penderita SMK dibanding orang normal. (Dursun, 2002)

Berbagai penelitian menyatakan bahwa inflamasi konjungtiva terjadi pada lebih dari 80% penderita SMK. sitokin proinflamasi tertentu, seperti IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ , terdeteksi dalam konsentrasi yang lebih tinggi pada air mata, epitel konjungtiva, dan epitel kornea penderita SMK dibandingkan orang normal. (Rashid, 2009) Sitokin-sitokin tersebut akan merangsang infiltrasi sel-sel inflamasi. Hiperosmolaritas air mata diduga merupakan penyebab terjadinya inflamasi permukaan bola mata pada SMK. Hiperosmolaritas air mata dan efek mikroabrasif kedepan pada kondisi mata kering menyebabkan terbentuknya sitokin proinflamasi yang merupakan perantara penting yang terlibat dalam proses inflamasi pada SMK. IL-1 dan TNF- $\alpha$  menginduksi sel epitel konjungtiva dan sel-sel inflamasi untuk memproduksi beberapa enzim matrix metalloproteinase (MMP), yaitu MMP-2, MMP-3, dan MMP-9. Enzim tersebut berfungsi untuk mendegradasi matrix ekstraseluler pada membran basal epitel kornea dan mengaktifasi sitokin proinflamasi yang

terdapat di air mata dalam bentuk laten, seperti pro-IL-1 $\beta$ , pro-TNF- $\alpha$ , dan substansi P. (Stahl, 2003)

Adanya inflamasi subklinis permukaan bola mata pada penderita SMK ditandai dengan hal-hal berikut : (Stahl, 5 2003)

Peningkatan ekspresi penanda aktivasi imun pada epitel konjungtiva, yaitu HLA-DR, intercellular adhesion molecule (ICAM-1), dan CD-40.

Infiltrasi sel inflamasi pada konjungtiva.

10 Pemberian terapi antiinflamasi dapat memperbaiki gejala dan tanda SMK.

Meningkatnya sel-sel inflamasi dan konsentrasi sitokin proinflamasi pada permukaan bola mata dan air mata pada SMK berhubungan dengan meningkatnya ekspresi faktor-faktor proapoptotik pada epitel konjungtiva (Fas, Fas ligand, APO 15 2,7, CD 40, CD 40 ligand). Apoptosis sel dapat terjadi melalui 2 jalur, yaitu jalur ekstrinsik yang melibatkan interaksi antara death ligand dengan death receptor pada permukaan sel, dan jalur intrinsic yang diinduksi oleh 20 adanya kerusakan DNA, seperti akibat sinar ultraviolet dan agen kemoterapeutik. Kedua jalur tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan mitokondria sehingga terjadi pelepasan sitokrom c dan aktivasi caspase pada jalur berikutnya. Aktivasi caspase efektor akan mengakibatkan terjadinya 25 fragmentasi DNA dan pemecahan PARP yang berfungsi sebagai DNA repair, sehingga menyebabkan perubahan morfologis dan biokimia yang sesuai dengan proses apoptosis. (Yeh, 2003)

Meskipun jalur apoptosis yang terjadi pada SMK belum jelas, namun fenomena ini memegang peranan penting dalam

pathogenesis dan manifestasi klinis SMK. Terdeteksinya caspase 3 yang teraktivasi dan fragmen PARP p85 pada epitel konjungtiva bulbar dan tarsal serta pada epitel kornea sentral dan perifer hewan coba tikus model mata kering, 5 menunjukkan bahwa mediator apoptosis ini mungkin terlibat dalam pathogenesis SMK. Sitokin proinflamasi yang terbentuk pada permukaan bola mata penderita SMK akan mengaktivasi jalur ekstrinsik apoptosis. Kematian sel yang bertanggung jawab pada proteksi permukaan bola mata, misalnya sel 10 goblet konjungtiva, akan menyebabkan progresivitas SMK berlanjut. (Yeh, 2003)

Patent terkait dengan nigella sativa " Inhibitors of extracellular proteases (EP 1370272 A1/ WO2002069992A1, 2003)" : Penemuan ini memberikan ekstrak tumbuhan yang 15 diturunkan terdiri dari aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan manusia. Selain itu, jumlah aktivitas penghambatan dalam ekstrak dapat ditingkatkan dengan menekankan tanaman sebelum membentuk ekstrak. Ekstrak 20 masing-masing dibuat dengan proses standar dan menunjukkan kemampuan untuk menghambat satu atau lebih protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan manusia. Perpustakaan ekstrak dapat dibuat dari tanaman stres dan non-stres, dimana masing-masing ekstrak menunjukkan 25 aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih inhibitor protease ekstraseluler. Atau, semi-dimurnikan dan dimurnikan senyawa penghambat dapat diisolasi dari ekstrak mengikuti prosedur standar. Dalam satu aspek, ekstrak dengan aktivitas inhibisi dapat digunakan selama pemurnian 30 protein untuk meminimalkan degradasi karena protease ekstraseluler.

Ekstrak tanaman untuk pengobatan angiogenesis dan metastasis (EP 1539204 A1/ WO2004019961A1, 2005): Ekstrak dari bahan tanaman, atau molekul senyawa semi-purified/purified atau dibuat dari ekstrak yang menunjukkan kemampuan untuk memodulasi satu atau lebih kegiatan selular disediakan. Ekstrak mampu memperlambat, menghambat atau mencegah migrasi sel, misalnya, migrasi sel endotel atau sel neoplastik dan dengan demikian, penggunaan ekstrak untuk memperlambat, menghambat atau mencegah migrasi sel abnormal pada hewan juga disediakan. Metode pemilihan dan penyiapan ekstrak tumbuh-tumbuhan dan metode skrining ekstrak untuk menentukan kemampuan mereka untuk memodulasi satu atau lebih aktivitas seluler dijelaskan. Pemurnian atau semi-pemurnian satu atau lebih molekul dari ekstrak dijelaskan juga dimaksudkan serta penggunaan molekul, sendiri atau dalam kombinasi dengan ekstrak, untuk memperlambat, menghambat atau mencegah migrasi sel abnormal pada hewan.

Methods and therapeutic compositions comprising plant extracts for the treatment of cancer (EP 1816996 A4 / WO2006039807A1, 2007): Sebuah metode untuk mengobati kanker dengan menargetkan dua protease, MMP-9 dan cathepsin B disediakan. Terapi komposisi yang terdiri dari ekstrak tumbuh-tumbuhan satu atau lebih yang menghambat MMP-9 dan / atau cathepsin B, yang mampu menghambat migrasi sel neoplastik dan / atau endotel, pertumbuhan tumor, tumor-induced angiogenesis dan / atau metastasis juga disediakan. Komposisi terapi penemuan ini dapat digunakan dalam pengobatan kanker, dan, metode menghambat pertumbuhan tumor, metastasis tumor, dan / atau tumor-angiogenesis diinduksi menggunakan komposisi terapi sendiri atau dalam

kombinasi dengan agen anti kanker, oleh karena itu , juga disediakan.

Methods and therapeutic compositions comprising plant extracts for the treatment of cancer (EP 1816996 A1 /  
5 WO2006039807A1): Sebuah metode untuk mengobati kanker dengan menargetkan dua protease, MMP-9 dan cathepsin B disediakan. Terapi komposisi yang terdiri dari ekstrak tumbuh-tumbuhan satu atau lebih yang menghambat MMP-9 dan / atau cathepsin B, yang mampu menghambat migrasi sel  
10 neoplastik dan / atau endotel, pertumbuhan tumor, tumor-induced angiogenesis dan / atau metastasis juga disediakan. Komposisi terapi penemuan ini dapat digunakan dalam pengobatan kanker, dan, metode menghambat pertumbuhan tumor, metastasis tumor, dan / atau tumor-angiogenesis  
15 diinduksi menggunakan komposisi terapi sendiri atau dalam kombinasi dengan agen anti kanker, oleh karena itu , juga disediakan.

Inhibitors of extracellular proteases, (EP 1370272 A1/  
WO2002069992A1): Penemuan ini memberikan ekstrak tumbuhan  
20 yang diturunkan terdiri dari aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan manusia. Selain itu, jumlah aktivitas penghambatan dalam ekstrak dapat ditingkatkan dengan menekankan tanaman sebelum membentuk ekstrak.  
25 Ekstrak masing-masing dibuat dengan proses standar dan menunjukkan kemampuan untuk menghambat satu atau lebih protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan manusia. Perpustakaan ekstrak dapat dibuat dari tanaman stres dan non-stres, dimana masing-masing ekstrak  
30 menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih inhibitor protease ekstraseluler. Atau, semi-dimurnikan dan

dimurnikan senyawa penghambat dapat diisolasi dari ekstrak mengikuti prosedur standar. Dalam satu aspek, ekstrak dengan aktivitas inhibisi dapat digunakan selama pemurnian protein untuk meminimalkan degradasi karena protease ekstraseluler.

### **Uraian Singkat Invensi**

Pembuatan Ekstrak bubuk biji *Nigella sativa* merupakan Prosedur persiapan ekstrak *Nigella sativa* adalah modifikasi metode Farah (2005). Bubuk *Nigella sativa* didapatkan secara komersial. Serbuk *N. sativa* diekstrak dengan pelarut etanol secara maserasi. Sebanyak 50 g bubuk *N. sativa* ditambah dengan 150 ml etanol 95% kemudian dihomogenasi. Larutan disimpan dalam refrigerator suhu 4°C dalam waktu semalam. Ekstrak *N. sativa* dalam etanol kemudian dipekatkan dalam Rotary Evaporator suhu 35°C. Selanjutnya ekstrak diuapkan hingga didapat kristal padatan. Produk hasil pengeringan sebanyak 1000 mg kemudian dilarutkan dengan 1 ml DMSO. Hasil ekstrak etanol selanjutnya diencerkan sehingga didapatkan fraksi pengenceran 1 mg/ml.

20

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak jintan hitam terhadap ekspresi IL-1 konjungtiva tikus yang di ovariektomi ( $p < 0,05$ ). Pada analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi IL 1 yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi IL 1 konjungtiva adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan maka penurunan ekspresi sitokin IL 1 semakin bermakna. Pemberian invensi ini dapat menurunkan inflamasi konjungtiva yang ditandai dengan menurunnya ekspresi sitokin proinflamasi IL 1. Penurunan proses

30

inflamasi pada konjungtiva ini pada akhirnya akan memperbaiki kerusakan pada permukaan bola mata penderita SMK.

5 Pemberian invensi ini menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak jintan hitam terhadap ekspresi MMP 9 epitel kornea. Pada analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi MMP 9 yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan  
10 penurunan ekspresi MMP 9 epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan maka penurunan ekspresi MMP 9 semakin bermakna. Invensi ini dapat menurunkan inflamasi epitel kornea yang ditandai dengan menurunnya ekspresi MMP 9. Penurunan MMP 9 ini  
15 menunjukkan berkurangnya degradasi matrix metalloproteinase dalam arti berkurangnya kerusakanyang terjadi pada permukaan bola mata penderita SMK.

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat peningkatan bermakna dari invensi ini terhadap ekspresi MMP 9 epitel  
20 kornea. Pada analisa lanjutan didapatkan peningkatan ekspresi MMP 9 yang menyerupai bahkan melebihi kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi EGFR epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB.  
25 Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan maka peningkatan ekspresi EGFR semakin bermakna.

Hasil uji pemberian invensi ini terhadap ekspresi EGFR sebagai salah satu parameter faktor reepitelisasi  
30 telah sesuai dengan hipotesa penelitian. yaitu terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian ekstrak jintan hitam dengan peningkatan reepitelisasi epitel kornea yang

ditandai dengan peningkatan ekspresi EGFR. Peningkatan EGFR ini menunjukkan perbaikan reepitelisasi pada permukaan bola mata penderita SMK.

5 Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak invensi ini terhadap ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea penderita menopause. Pada analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi PMN yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang  
 10 dapat menyebabkan penurunan ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan maka penurunan ekspresi EGFR semakin bermakna.

Hasil pengujian pemberian invensi ini terhadap  
 15 ekspresi PMN sebagai salah satu parameter faktor inflamasi telah terbukti dapat menurunkan inflamasi epitel konjungtiva dan kornea yang ditandai dengan penurunan ekspresi PMN. Penurunan ekspresi PMN ini menunjukkan perbaikan kondisi inflamasi di permukaan bola mata  
 20 penderita SMK.

Sediaan 1 mg/ml jintan hitam untuk dosis 2,5, 5, dan 10 mg/kg BB/hari. Sehingga dengan berat tikus rata-rata 185 gram dibutuhkan untuk: Dosis 2.5 mg/kg BB/hari =  $0,185 \times 2.5 = 0.4625$  mg/ hari = 0.46 cc/hari. Dosis 5 mg/kg BB/hari =  $0,185 \times 5 = 0.925$  mg/ hari = 0.93 cc/hari. Dosis 10 mg/kg BB/hari =  $0,185 \times 10 = 1.85$  mg/ hari = 1,85 cc/hari

### Uraian Lengkap Invensi

30 Secara epidemiologis angka kejadian Sindroma Mata Kering meningkat setelah menopause sehingga diduga hormon

seks steroid memegang peranan penting dalam patogenesis terjadinya SMK. Penanan estrogen sebagai salah satu hormon seks steroid terhadap terjadinya SMK cukup penting, karena ditemukannya reseptor estrogen pada konjungtiva dan kornea  
5 hewan coba serta manusia. Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus, dimana telah terbukti pada penelitian sebelumnya oleh Tachibana et al bahwa pada konjungtiva dan kornea tikus didapatkan reseptor estrogen Alpha dan Beta (Tachibana M, 2000).

#### 10 **Pemberian invensi ini dapat menurunkan inflamasi konjungtiva**

Teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi peningkatan spontan dari ekspresi dan konsentrasi sitokin-sitokin proinflamasi, termasuk IL 1. Ekspresi sitokin IL 1  
15 tampak menurun setelah pemberian ekstrak N. Sativa.

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak jintan hitam terhadap ekspresi IL-1 konjungtiva tikus yang di ovariektomi ( $p < 0,05$ ). Pada  
20 analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi IL 1 yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi IL 1 konjungtiva adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan maka penurunan ekspresi sitokin IL 1  
25 semakin bermakna.

Peningkatan sitokin proinflamasi terbukti meningkatkan jumlah  $ER\beta$  disbanding  $ER\alpha$ , terutama pada kondisi inflamasi kronis. Bila hal ini terjadi, maka pemberian ekstrak jintan hitam yang afinitas ikatannya  
30 lebih besar pada  $ER\beta$  dibandingkan  $ER\alpha$  sangat membantu untuk menurunkan ekspresi IL 1 karena ikatan yang terjadi antara  $ER\beta$  dengan ligandnya bersifat menghambat transkripsi.

Pengaruh jintan hitam terhadap ekspresi IL 1 tergantung jenis sel, kondisi lingkungan, dan konsentrasi jintan hitam yang diberikan. Terdapat faktor-faktor lain di dalam jenis sel yang berbeda, yang menyebabkan terjadinya efek yang spesifik pada sel yang berbeda. Invensi ini menunjukkan ekspresi IL 1 yang menurun pada pemberian jintan hitam dosis 2,5 mg/kgBB, 5 mg/kgBB, dan 10 mg/kgBB terjadi karena ikatan antara jintan hitam dengan ER akan menghambat aktivasi promotor gen IL 1, sehingga protein inflamasi yang diinduksi IL 1 pada konjungtiva juga akan menurun. DARI grafik hubungan dosis dan respon tampak bahwa dosis jintan hitam yang diduga dapat menyebabkan penurunan IL 1 konjungtiva hingga sama dengan kondisi kontrol negatif adalah 10 mg/kgBB.

Pemberian invensi ini dapat menurunkan inflamasi konjungtiva yang ditandai dengan menurunnya ekspresi sitokin proinflamasi IL 1. Penurunan proses inflamasi pada konjungtiva ini pada akhirnya akan memperbaiki kerusakan pada permukaan bola mata penderita SMK.

20

#### **Pemberian ekstrak jintan hitam berpengaruh terhadap ekspresi MMP 9 epital kornea**

Sejalan dengan teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi peningkatan spontan dari ekspresi dan konsentrasi sitokin-sitokin proinflamasi, yang memacu pengaktifasian jalur MAPK sebagai regulator utama transkripsi MMP. Ekspresi MMP 9 tampak menurun setelah pemberian ekstrak N. Sativa.

Pemberian invensi ini menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak jintan hitam terhadap ekspresi MMP 9 epitel kornea. Pada analisa lanjutan

30

didapatkan penurunan ekspresi MMP 9 yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi MMP 9 epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan  
5 maka penurunan ekspresi MMP 9 semakin bermakna.

Metaloproteinase matriks (MMPs) bertanggung jawab untuk degradasi matriks ekstraseluler dan memainkan peran penting dalam migrasi sel, proliferasi, dan remodeling jaringan yang terkait dengan proses inflamasi. Interleukin-  
10 1beta (IL-1beta) menginduksi MMP-9 produksi di banyak tipe sel dan berkontribusi terhadap respon inflamasi. Mekanisme yang mendasari induksi MMPs oleh sitokin IL 1 $\beta$  (HTSMCs) hingga saat ini masih menjadi perdebatan para ahli. Diduga terdapat peran p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, dan NF-kappaB  
15 jalur untuk IL-1beta-induced-9 MMP produksi HTSMCs. IL-1beta diinduksi produksi MMP-9 protein dan mRNA dalam waktu-dan cara tergantung konsentrasi ditentukan oleh zymographic, Western blotting, dan RT-PCR analisis, yang dilemahkan oleh inhibitor dari MEK1 / 2 (U0126), p38 MAPK  
20 (SB202190), JNK (SP600125), dan NF-kappaB (helenalin), dan transfeksi dengan mutan negatif dominan MEK1 / 2, p38 dan JNK, masing-masing. IL-1beta-dirangsang fosforilasi p42/p44 MAPK, p38 MAPK, dan JNK adalah dilemahkan oleh pretreatment dengan U0126,, SB202190 SP600125, atau transfeksi dengan  
25 mutan negatif dominan MEK, ERK, p38 dan JNK, masing-masing. Translokasi Selanjutnya, IL-1beta-dirangsang dari NF-kappaB ke dalam inti dan degradasi IkappaB-alpha diblokir oleh helenalin. Akhirnya, uji gen mengungkapkan bahwa MAPKs dan NF-kappaB diperlukan untuk IL-1beta-induced-9 MMP aktivitas  
30 luciferase dalam HTSMCs. MMP-9 aktivitas promotor ditingkatkan oleh IL-1beta di HTSMCs transfected dengan MMP-9-Luc, yang dihambat oleh helenalin,, U0126 SB202190,

dan SP600125. Diambil bersama-sama, faktor transkripsi NF-kappaB, p42/p44 MAPK, p38 MAPK, dan JNK yang terlibat dalam MMP-9 ekspresi dalam HTSMCs terkena IL-1beta kini telah diidentifikasi.

5           Invensi ini dapat menurunkan inflamasi epitel kornea yang ditandai dengan menurunnya ekspresi MMP 9. Penurunan MMP 9 ini menunjukkan berkurangnya degradasi matrix metalloproteinase dalam arti berkurangnya kerusakanyang terjadi pada permukaan bola mata penderita SMK.

10

**Pemberian ekstrak jintan hitam invensi ini terhadap ekspresi EGFR epital kornea:**

Teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi  
15 penurunan regenerasi dan reepitelisasi yang ditandai dengan penurunan EGF-EGFR. Ekspresi EGFR tampak meningkat setelah pemberian ekstrak N. Sativa.

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat peningkatan bermakna dari invensi ini terhadap ekspresi MMP 9 epitel  
20 kornea. Pada analisa lanjutan didapatkan peningkatan ekspresi MMP 9 yang menyerupai bahkan melebihi kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi EGFR epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan  
25 maka peningkatan ekspresi EGFR semakin bermakna.

Sinyal transduksi yang dimediasi oleh EGFR dapat melalui berbagai jalur untuk mencapai target *nuclear transcription factor* di sel. EGF yang berikatan dengan reseptornya (EGFR) akan mengalami dimerisasi, sehingga  
30 terjadi aktivasi domain tyrosine kinase dan autofosforilasi reseptor. Phospholipase C (PLC, sebuah enzim membran) mengikat domain phosphotyrosine pada EGFR dan diaktivasi

oleh fosforilasi tyrosine melalui protein G. Pada sel epitel kornea, aktivasi EGFR dapat terjadi akibat perangsangan PLC dan phospholipase D (PLD). PLC yang teraktivasi menghidrolisa phosphalidylinositol-4, 5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>), menimbulkan aktivasi *second messenger* diacylglycerol (DAG) dan inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Selain itu, aktivasi PLC terjadi karena perangsangan PIP<sub>3</sub> kinase. IP<sub>3</sub> dan DAG mengaktivasi protein kinase C (PKC) dengan jalan melepaskan Ca<sup>2+</sup> dari intraseluler, sehingga mengaktivasi Ca/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) dan memfasilitasi aktivasi PKC. DAG akan mengaktivasi PKC yang akan menimbulkan aktivasi jalur mitogen-activated protein (MAP) kinase dimana pada akhirnya mengaktivasi MAPK.

Jalur aktivasi EGFR selain jalur tyrosine autophosphorylation diatas adalah dengan berikatan pada domain homolog Src protein *adapter*, selanjutnya akan terjadi aktivasi Ras, sebuah protein yang berikatan dengan GTP, diikuti dengan aktivasi jalur MAP kinase. Pada jalur ini, Raf merupakan titik kunci *cascade* MAPK. Raf merupakan bagian dari kontrol reseptor di nukleus yang muncul sebagai respon terhadap stress, pertumbuhan, diferensiasi, dan sitokin yang berhubungan dengan apoptosis. Anggota dari Raf yang memberikan respon terhadap perangsangan *growth factor* adalah *extracellular signal reponse kinases* 1 dan 2 (Erk-1 dan Erk-2). Raf juga mengacu pada aktivasi MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) atau MEKK yang akhirnya memfosforilasi MAPK. Terdapat dua bentuk isoform MAP kinase, yaitu p44 MAPK (Erk-1) dan p42 MAPK (Erk-2), yang diekspresikan pada sebagian besar sel. Substrat MAPK adalah *nuclear transcription factor* dan non nuklear seperti protein, serine/threonine kinase p90sk, dan sitoskeletal.

EGF yang menginduksi aktivasi transkripsi nuklear akan merangsang proliferasi sel dengan memulai progresivitas fase G ke fase S dalam siklus sel. Substrat yang mengaktivasi MAPK lain adalah phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) yang akan mengkatalisasi pelepasan asam arachidonat dari fosfolipid dalam membran dan salah satu langkah dalam sintesa prostagandin dan eicosanoid lain.

Hasil uji pemberian invensi ini terhadap ekspresi EGFR sebagai salah satu parameter faktor reepitelisasi telah sesuai dengan hipotesa penelitian, yaitu terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian ekstrak jintan hitam dengan peningkatan reepitelisasi epitel kornea yang ditandai dengan peningkatan ekspresi EGFR. Peningkatan EGFR ini menunjukkan perbaikan reepitelisasi pada permukaan bola mata penderita SMK.

#### **Pemberian Invensi ini terhadap ekspresi PMN epital kornea**

Sejalan dengan teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi migrasi sel-sel leukosit ke konjungtiva dan kornea yang ditandai dengan peningkatan PMN di konjungtiva dan kornea. Ekspresi PMN tampak menurun setelah pemberian ekstrak invensi ini.

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak invensi ini terhadap ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea penderita menopause. Pada analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi PMN yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam yang diberikan maka penurunan ekspresi EGFR semakin bermakna.

Leukosit polimorfonuklear (PMN atau neutrofil) merupakan komponen penting dari sistem kekebalan tubuh bawaan manusia. Neutrofil beredar dengan cepat menuju daerah host dan / atau patogen yang diturunkan komponen, yang juga pertahanan pertama pada saat terjadi kondisi peradangan. PMN mengikat dan menelan mikroorganisme dengan proses dikenal sebagai fagositosis, yang biasanya memicu produksi oksigen reaktif dan fusi butiran sitoplasma bervakuola. Kombinasi neutrofil spesies oksigen reaktif dan komponen granul sangat efektif dalam membunuh sebagian besar bakteri dan jamur. Sejauh PMN adalah jenis yang paling melimpah di leukosit manusia dan mengandung gudang senyawa sitotoksik yang non-spesifik, neutrofil homeostasis harus diatur secara ketat. Untuk itu, PMN konstitutif diatur oleh apoptosis, suatu proses dimana sel-sel dihapus dengan aman oleh makrofag. Khususnya, apoptosis dipercepat menyusul fagositosis bakteri, sebuah proses yang muncul penting untuk resolusi inflamasi.

Hasil pengujian pemberian invensi ini terhadap ekspresi PMN sebagai salah satu parameter faktor inflamasi telah terbukti dapat menurunkan inflamasi epitel konjungtiva dan kornea yang ditandai dengan penurunan ekspresi PMN. Penurunan ekspresi PMN ini menunjukkan perbaikan kondisi inflamasi di permukaan bola mata penderita SMK.

Pada penelitian sebelumnya diberikan dosis ekstrak jintan hitam sebesar 2,5 - 5 mg/kg BB /hari untuk melihat dampak jintan hitam terhadap perbaikan tikus model artiritis rematoid. Didapatkan sediaan 1 mg/ml jintan hitam untuk dosis 2,5, 5, dan 10 mg/kg BB/hari. Sehingga dengan berat tikus rata-rata 185 gram dibutuhkan untuk

Dosis 2.5 mg/kg BB/hari =  $0,185 \times 2.5 = 0.4625$  mg/ hari =  
0.46 cc/hari

Dosis 5 mg/kg BB/hari =  $0,185 \times 5 = 0.925$  mg/ hari = 0.93  
cc/hari

5 Dosis 10 mg/kg BB/hari =  $0,185 \times 10 = 1.85$  mg/ hari = 1,85  
cc/hari

Pengaruh ekstrak jintan hitam pada hewan coba tikus yang diperoleh pada penelitian ini perlu dikaji pada  
10 manusia. Terdapat beberapa perbedaan yang mungkin menyebabkan terjadinya efek yang berbeda. Perbedaan pertama adalah rute pemberian, dimana pemberian pada manusia adalah secara oral, sehingga konsentrasi plasma yang dicapai akan lebih rendah dibandingkan pemberian sub cutan, akibat  
15 adanya proses metabolisme dinding usus. Perbedaan kedua adalah interval waktu antara terjadinya menopause dengan pemberian ekstrak jintan hitam. Semakin lama interval waktu antara terjadinya menopause dengan pemberian jintan hitam maka efeknya bisa jadi akan semakin menurun akibat  
20 berkurangnya jumlah reseptor estrogen.

**Klaim**

1. Pembuatan Ekstrak bubuk biji *Nigella sativa* dalam invensi ini menggunakan metode Farah (2005) yang dimodifikasi. Adapun prosedur tersebut adalah sbb:
  - 5 Serbuk *N. sativa* diekstrak dengan pelarut etanol secara maserasi. Sebanyak 50 g bubuk *N. sativa* ditambah dengan 150 ml etanol 95% kemudian dihomogenasi. Larutan disimpan dalam refrigerator suhu 4°C dalam waktu semalam. Ekstrak *N. sativa* dalam etanol kemudian
  - 10 dipekatkan dalam Rotary Evaporator suhu 35°C. Selanjutnya ekstrak diuapkan hingga didapat kristal padatan. Produk hasil pengeringan sebanyak 1000 mg kemudian dilarutkan dengan 1 ml DMSO. Hasil ekstrak etanol selanjutnya diencerkan sehingga didapatkan fraksi pengenceran 1 mg/ml.
2. Pemberian ekstrak jintan hitam sebagaimana dihasilkan klaim 1 adalah untuk :
  - a) penurunan faktor-faktor inflamasi IL 1 pada konjungtiva pada kornea, penderita menopause.
  - 20 b) penurunan faktor-faktor inflamasi MMP 9 pada kornea , penderita menopause.
  - c) penurunan faktor-faktor inflamasi PMN pada konjungtiva kornea , penderita menopause.
  - d) peningkatan growth factor / reepitelisasi (EGFR)
  - 25 pada kornea , penderita menopause.
3. Pemberian ekstrak jintan hitam dari klaim 1 untuk digunakan sebagaimana disebutkan dalam klaim 2, telah dicobakan pada tikus coba dengan dosis minimal 2,5 mg/kg BB per hari, hingga 10 mg/kg BB/hari. Hal ini pada
- 30 manusia setara dengan *Nigella Sativa* 500 mg/hari hingga dosis 1000 mg/hari. Pemberian tersebut selama 10 hari hingga 1 bulan.

4. Komposisi farmasi ekstrak biji jintan hitam sebagaimana klaim 1 untuk digunakan sebagai obat sebagaimana klaim 2 dapat mengandung selain ekstrak biji jintan hitam sekurang kurangnya satu bahan aktif terapi lain dan  
5 dapat mengandung sekurang kurangnya satu bahan pengisi yang dapat bercampur secara farmasi.
5. Komposisi menurut klaim 1 dan klaim 4, dicirikan bahwa komposisi ada dalam bentuk bubuk, tablet, pil, kapsul, pil salut gula, suspense krem, pasta, sirup atau sachet.
- 10 6. Komposisi menurut salah satu dari klaim 1, 3, 4, dan 5, untuk diberikan dengan metode oral, sublingual.

**Abstrak**

**FORMULA EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI  
PENGHAMBAT PROSES INFLAMASI KONJUNGTIVA DAN KORNEA  
(INTERLEUKIN 1 / IL1 DAN MATRIX MATALLOPROTEINASE 9 / MMP-  
9) DAN PROSES EPITELISASI KORNEA**

5

Invensi berkaitan Formula ramuan terapi yang dipergunakan untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1 dan matrix matalloproteinase 9 / MMP-9 ) dan proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR

10

Ekstrak *Nigella sativa* dalam invensi ini dibuat dengan metode Farah (2005) yang di modifikasi menggunakan pelarut etanol secara maserasi. Sebanyak 50 g bubuk *N sativa* ditambah dengan 150 ml etanol 95% kemudian dihomogenasi. Larutan disimpan dalam refrigerator suhu 4°C dalam waktu semalam. Ekstrak *N. sativa* dalam etanol dipekatkan dalam Rotary Evaporator suhu 35°C. Ekstrak tersebut diuapkan hingga didapat kristal padatan. Produk hasil pengeringan sebanyak 1000 mg kemudian dilarutkan dengan 1 ml DMSO. Hasil ekstrak etanol selanjutnya diencerkan sehingga didapatkan fraksi pengenceran 1 mg/ml.

15

20

Pemberian ekstrak jintan hitam dalam invensi ini adalah obat bagi penderita menopause untuk : a) obat penurun faktor-faktor inflamasi IL 1 pada konjungtiva pada kornea; b) obat penurun faktor-faktor inflamasi MMP 9 pada kornea c) obat penurun faktor-faktor inflamasi PMN pada konjungtiva kornea. d) Obat untuk meningkatkan growth factor / reepitelisasi (EGFR) pada kornea , .

25

Dosis penggunaannya adalah 500 mg/hari hingga dosis 1000 mg/hari. Pemberian tersebut selama 10 hari hingga 1 bulan.

30