PENGARUH APLIKASI EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH FIBROBLAS PADA LUKA MUKOSA ORAL TIKUS (STUDI IN VIVO)

AURA ANANDA PURNAMA
J011211020

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

PENGARUH APLIKASI EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH FIBROBLAS PADA LUKA MUKOSA ORAL TIKUS (STUDI IN VIVO)

AURA ANANDA PURNAMA
J011211020

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

PENGARUH APLIKASI EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH FIBROBLAS PADA LUKA MUKOSA ORAL TIKUS (STUDI IN VIVO)

AURA ANANDA PURNAMA
J011211020

Skripsi

sebagai salah satu syarat mencapai gelar sarjana

Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

pada

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI
DEPARTEMEN ILMU KEDOKTERAN GIGI ANAK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

SKRIPSI

PENGARUH APLIKASI EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH FIBROBLAS PADA LUKA MUKOSA ORAL TIKUS (STUDI IN VIVO)

AURA ANANDA PURNAMA
J011211020

Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Kedokteran Gigi pada 15 Oktober 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan pada

Program Studi Pendidikan Dokter Gigi
Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak
Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Pembimbing Tugas Akhir,

Prof. Dr. drg. Sherly Horax, MS.
NIP.195804031986032002

Mengetahui:
Ketua Program Studi,

drg. Muhammad Ikbal, Ph.D., Subsp. PKIKG (K)
NIP.198010212009121002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Pengaruh Aplikasi Ekstrak Jintan Hitam (Nigella sativa) Terhadap Peningkatan Jumlah Fibroblas Pada Luka Mukosa oral Tikus (Studi In Vivo)" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Prof. Dr. drg. Sherly Horax, MS. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 30 Oktober 2024

AURA ANANDA PURNAMA

J011211020

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan atas kehadirat Allah SWT. karena berkat rahmat, ridha, serta hidayah-Nya lah yang senantiasa memberikan kemudahan dan kelancaran dalam penyusunan skripsi ini. Shalawat serta salam tak lupa kita kirimkan kepada Rasulullah SAW, berserta para keluarga, sahabat dan para pengikutnya yang telah membawa umat Islam kepada zaman yang penuh kesyukuran. Dalam penyusunan skripsi ini, tentunya tidak terlepas dari bantuan, bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini, yaitu kepada:

1. Kepada orang tua tercinta, Purnomosidi S.A.P. dan Lale Purnamayanti A.Md.A.K., yang telah memberikan dukungan baik secara emosional dan finansial kepada penulis. Dukungan, harapan dan doa kalian adalah nikmat yang penulis sangat syukuri.
2. Irfan Sugianto, drg., M.Med.Ed., Ph.D selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin
3. Prof. Dr. Sherly Horax, drg., M.S., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing, serta memberikan arahan dan saran kepada penulis selama proses penyusunan dan penyelesaian skripsi ini.
4. Kementrian Kesehatan melalui Beasiswa Afirmasi Kemenkes
5. Adam Malik Hamudeng, drg., M.Med.Ed. dan Nurhaedah H. Galib B, drg., Sp.KGA. selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan arahan, masukan, kritik, dan saran kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
6. Prof. Dr. Irene Edith Rieuwpassa, drg., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah banyak memberikan arahan, bimbingan, ilmu dan motivasi untuk penulis dalam menyelesaikan jenjang perkuliahan dengan baik.
7. Sahabat tersayang penulis, Mahdiyyah Mufadhdhal Ansar, Nur Ismi, Az-Zikra Adelia Syamsuri dan Nadia Ayu Sagita. Teman-teman ODAPUS UNHAS 2024, Abd. Raqib, Imran dan Wiwi. Teman-teman terdekat penulis Abil, Qay, Irsyadi dan Fadlur. Teman-teman Korps Asisten Oral Biologi 2021 serta segenap keluarga besar seperjuangan INKREMENTAL 2021 yang telah membersamai penulis dari awal hingga akhir perkuliahan.

Penulis,

Aura Ananda Purnama

ABSTRAK

AURA ANANDA PURNAMA. **Pengaruh aplikasi ekstrak jintan hitam (nigella sativa) terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada luka mukosa oral tikus (studi in vivo)** (dibimbing oleh Sherly Horax)

Latar belakang. *N. sativa* dan bahan aktifnya menunjukkan berbagai sifat farmakologis, termasuk antibakteri, antiinflamasi, penghambat pelepasan histamin, penurun tekanan darah, penurun kadar gula darah, kemampuan pencegahan kanker, dan sifat antioksidan. Namun, belum ada konsentrasi yang paling efektif dari ekstrak ini. **Tujuan**. Bertujuan mengetahui pengaruh aplikasi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dan variasi persentase kandungan ekstraknya terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada luka mukosa oral tikus. **Metode**. Jenis penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post only control group design*, dengan 4 kelompok yang diberi perlakuan dan 4 kelompok *control* kemudian dilakukan observasi. Ekstrak jintan hitam dilarutkan dengan pelarut etil asetat dengan konsentrasi 5% dan 10%. Euthanasia dilakukan pada hari ke-8 dan hari ke-15. Preparat sampel kemudian diteliti secara histologi fibroblas (magnifikasi 400x) dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE). Hasil data penelitian diolah dengan metode analisis *ANOVA* dan *Post Hoc Test* (Uji Benferroni). **Hasil**. Rata-rata jumlah fibroblas meningkat sangat tajam pada ekstrak *Nigella sativa* 5% dengan rata-rata jumlah fibroblas sebesar 111,67, sedangkan rata-rata terendah pada kelompok kontrol negatif dengan rata-rata jumlah fibroblas sebesar 25,33. Rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-14 dengan jumlah terendah pada ekstrak *Nigella sativa* 5% dengan rata-rata jumlah fibroblas sebesar 37,67, sedangkan rata-rata tertinggi pada kelompok ekstrak *Nigella sativa* 10% dengan rata-rata jumlah fibroblas sebesar 50,33. **Kesimpulan**. Peningkatan jumlah fibroblas menunjukkan bahwa aplikasi ekstrak *N. sativa* di hari ke-7 dan penurunan jumlah fibroblas yang lebih cepat pada hari ke-14 memberikan dampak positif dalam proses penyembuhan luka dibandingkan kelompok kontrol.

Kata Kunci: *Fibroblast, Nigella sativa*, luka, mukosa oral.

ABSTRACT

AURA ANANDA PURNAMA. **Effect of black cumin (nigella sativa) extract application on increasing the number of fibroblasts in oral mucosal wounds of rats (in vivo study)** (supervised by Sherly Horax)

Background. N. sativa and its active ingredients show various pharmacological properties, including antibacterial, anti-inflammatory, histamine release inhibitor, blood pressure lowering, blood sugar lowering, cancer prevention ability, and antioxidant properties. Still, there is no most effective concentration of this extract. **Objective**. The aim is to determine the effect of black cumin (*Nigella sativa*) extract application and variations in the percentage of its extract content on increasing the number of fibroblasts in oral mucosal wounds of rats. **Method**. The type of laboratory experimental research. The research design used was the post only control group design, with 4 groups given treatment and 4 control groups then observed. Black cumin extract was dissolved with ethyl acetate solvent with concentrations of 5% and 10%. Euthanasia was carried out on the 8th and 15th days. The sample preparation was then examined histologically for fibroblasts (400x magnification) with hematoxylin-eosin (HE) staining. The results of the research data were processed using the ANOVA analysis method and Post Hoc Test (Benferroni Test). **Results**. The average number of fibroblasts increased significantly in 5% *Nigella sativa* extract with an average number of fibroblasts of 111.67, while the lowest average was in the negative control group with an average number of fibroblasts of 25.33. The average number of fibroblasts on the 14th day with the lowest number in 5% *Nigella sativa* extract with an average number of fibroblasts of 37.67, while the highest average was in the 10% *Nigella sativa* extract group with an average number of fibroblasts of 50.33. **Conclusion**. The increase in the number of fibroblasts indicates that the application of *N. sativa* extract on the 7th day and the faster decrease in the number of fibroblasts on the 14th day have a positive impact on the wound healing process compared to the control group.

Keywords: Fibroblast, Nigella sativa, wound, oral mucosa.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL i
PERNYATAAN PENGAJUAN ii
HALAMAN PENGAJUAN iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI iv
UCAPAN TERIMA KASIH v
ABSTRAK vi
ABSTRACT vii
DAFTAR ISI viii
DAFTAR TABEL x
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR LAMPIRAN xiii
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1. Latar belakang 1
1.2. Rumusan masalah 3
1.3. Tujuan penelitian 3
1.4. Manfaat penelitian 3
1.5. Studi teori 4
1.6. Hipotesis 24
BAB II METODOLOGI PENELITIAN 24
2.1. Jenis dan rancangan penelitian 24
2.2. Lokasi dan waktu penelitian 24
2.3. Variabel dan definisi operasional penelitian 24
2.4. Teknik dan besar sampel penelitian 25
2.5. Prosedur penelitian 25
2.6. Alur penelitian 29
BAB III HASIL PENELITIAN 30
3.1. Hasil penelitian 30
3.3. Analisis data hasil penelitian 33
Bab IV PEMBAHASAN 35
4.1. Perbandingan antar kelompok perlakuan 35
4.2. Pengaruh ekstrak biji jintan hitam (*nigella sativa)* terhadap peningkatan

jumlah fibroblas 35
4.3. Perbandingan dengan studi sebelumnya 37
4.4. Keterbatasan penelitian 39
BAB V KESIMPULAN 40
DAFTAR PUSTAKA 41
LAMPIRAN 45

DAFTAR TABEL

Nomor urut Halaman

1. Taksonomi Jintan Hitam (Nigella Sativa) (Majeed et al., 2021). 12
2. Komposisi Jintan Hitam (Nigella Sativa) (Ahmad et al., 2021) 13
3. Etiologi inflamasi 17
4. Taksonomi tikus wistar (Rattus norvegicus) (Rosidah et al., 2020) 20
5. Uji Normalitas 33
6. Uji Homogenitas 33
7. Uji ANOVA 34
8. Uji Bonferroni 34

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut Halaman

1. Tahap penyembuhan luka 5

2. Perbandingan kulit dan mukosa sehat A) Tampakan histologis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan). Rasio 100 mikrometer. B) Ilustrasi grafis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan) 9

3. Perbandingan kulit dan mukosa sehat A) Tampakan histologis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan). Rasio 100 mikrometer. B) Ilustrasi grafis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan)..... 11

4. a) Bunga jintan hitam dan b) biji jintan hitam 12

5. Total senyawa Flavonoid ekstrak biji jintan hitam 13

6. Manfaat jintan hitam 14

7. Mekanisme penyembuhan luka N. sativa dan *thymoquinone*. Efek positif thymoquinone pada penyembuhan luka kulit terutama berasal dari efek antibakterinya, induksi angiogenesis, anti-inflamasi, dan sifat antioksidan serta peningkatan proliferasi fibroblas. 15

8. Ringkasan fungsi dan output fibroblas. Peran inti fibroblas (ditampilkan di pusat gambar) dan turunan mesenkimalnya melibatkan sekresi dan remodelling matriks ekstraseluler (ECM) (A), pengeluaran faktor sinyal untuk sel tetangganya (B), penghasilan kekuatan mekanis (C), dan pengaturan metabolisme jaringan serta ekskresi metabolit (D). Fibroblas juga bertindak sebagai sel induk untuk turunan mesenkimalnya (E), berfungsi sebagai "arsitek" pembentukan jaringan baru selama morfogenesis organ, proses penyembuhan jaringan, dan dalam berbagai kondisi patologis (F), memainkan peran penting dalam memberikan informasi posisi di berbagai wilayah anatomi dalam organ yang sama dan sebagai penyedia sinyal utama menuju kompartemen sel induk (G), serta menjadi target dan pengatur reaksi timbal balik dari fungsi imun bawaan dan adaptif yang beragam (H) 19

9. Tikus wistar (Rattus novergius) 21

10. Skema model dan terapi terkini untuk mendorong penyembuhan luka oral 22

11. Rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-7 kelompok perlakuan kontrol positif povidone iodine (PVI), kontrol negatif aquades (Aq), ekstrak Nigella sativa 5% (N.s 5%) dan ekstrak Nigella sativa 10% (N.s 10%) 30

12. Tampakan histologi jaringan hari ke-7 dengan *hematoksilin-eosin staining* (magnifikasi 400×): (a) kontrol positif, (b) kontrol negatif, (c) ekstrak *Nigella sativa* (5%), (d) ekstrak *Nigella sativa* (10%). Panah hitam menunjukkan fibroblas yang berwarna ungu pada tampakan histologi. 31

13. Rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-14 kelompok perlakuan kontrol positif povidone iodine (PVI), kontrol negatif aquades (Aq), ekstrak Nigella sativa 5% (N.s 5%) dan ekstrak Nigella sativa 10% (N.s 10%) 31

14. Tampakan histologi jaringan hari ke-14 dengan hematoksilin-eosin staining (magnifikasi 400×): (a) kontrol positif, (b) kontrol negatif, (c) ekstrak Nigella sativa (5%), (d) ekstrak Nigella sativa (10%). Panah hitam menunjukkan fibroblas yang berwarna ungu pada tampakan histologi. 32

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut Halaman

1. Surat Rekomendasi Persetujuan Etik Penelitian 45
2. Surat Izin Penelitian 46
3. Dokumentasi Kegiatan (Perlakuan Pada Hewan Coba) 47
4. Analisis Post Hoc Test (Uji Benferroni) 48
5. Kartu Kontrol Skripsi 63
6. Rincian Anggaran Biaya (RAB) 65

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Rongga mulut adalah penghubung terpenting antara tubuh manusia dan lingkungan eksternal dari serangan patogen (Iyer, 2023). Rongga mulut dilapisi oleh lapisan mukosa mulut yang bertugas melindungi jaringan di dalamnya. Mukosa mulut terdiri dari dua komponen utama, yaitu epitel skuamosa berlapis dan lapisan jaringan ikat yang disebut lamina propria (Primasari et al., 2023). Sel epitel utamanya terdiri dari keratinosit, sedangkan lamina propria terdiri dari beragam sel dan struktur seperti fibroblas, limfosit, makrofag, leukosit, eosinofil, sel mast, sel plasma, dan pembuluh darah kecil (Primasari dan Sinulingga, 2019). Berbagai faktor seperti trauma, suhu ekstrem, paparan bahan kimia, dan kontak dengan zat listrik bisa menyebabkan luka pada mukosa mulut (Nanci, 2018). Disrupsi pada integritas anatomi rongga mulut berdampak pada kesehatan rongga mulut (Stoica et al., 2022).

Menurut *World Health Organization* (WHO), kesehatan mulut didefinisikan sebagai keadaan mulut, gigi, dan struktur orofasial yang memfasilitasi individu dalam menjalankan fungsi-fungsi penting seperti makan, bernapas, dan berbicara. Definisi ini juga mencakup aspek-aspek psikososial, seperti tingkat kepercayaan diri, kesejahteraan, dan kemampuan untuk menjaga kesehatan mulut, sehingga individu dapat berinteraksi sosial dan bekerja tanpa mengalami rasa sakit, ketidaknyamanan, atau perasaan malu. Tidak dapat dipungkiri bahwa kesehatan rongga mulut memiliki peran penting dalam kualitas hidup, produktivitas, kemampuan bekerja, dan partisipasi sosial. Pada tahun 2019, sekitar 3,5 miliar individu di seluruh dunia mengalami masalah kesehatan mulut. Hal ini menjadikan penyakit mulut sebagai salah satu kondisi kesehatan dengan penyebaran terbesar di antara lebih dari 300 kondisi yang memengaruhi populasi manusia (WHO, 2022). Salah satu diantaranya adalah ulserasi mulut.

Ulserasi adalah indikator umum dari beragam penyakit rongga mulut yang melibatkan berbagai etiologi (Fitzpatrick et al., 2019). Ulserasi mulut merupakan suatu kondisi terjadinya diskontinuitas mukosa mulut yang disebabkan oleh kerusakan epitel dan lamina propia mukosa mulut (Sundharam et al., 2018). Recurrent stomatitis aphthous (RAS) merupakan jenis ulserasi yang umum terjadi di rongga mulut. Istilah “sariawan” sering digunakan oleh pasien dan tenaga medis (Sanchez et al., 2020). RAS dilaporkan memengaruhi hingga 25% populasi dunia, penyakit ini ditandai dengan ulkus yang nyeri, berbentuk bulat, atau oval dengan lingkaran inflamasi (Basaran et al., 2022). RAS merupakan salah satu penyakit mulut yang paling banyak ditemui di Indonesia, dengan prevalensi 12% (Hariyani et al., 2020). Sejumlah faktor predisposisi, baik lokal, imun, mikroba, dan lainnya, telah diidentifikasi sebagai faktor pemicu dari RAS (Del Mazo, 2023). Meskipun demikian, penyebab pastinya masih belum

dipahami sepenuhnya. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa RAS dapat dipicu oleh berbagai faktor, dengan kecenderungan yang lebih tinggi terjadi pada perempuan (51,6%) daripada laki-laki (Novrinda, 2023).

Proses penyembuhan luka pada ulserasi oral adalah proses yang rumit dan melibatkan serangkaian peristiwa yang bekerja bersama-sama untuk menjaga keseimbangan dalam kulit dan akhirnya melindungi tubuh secara keseluruhan. Proses ini melibatkan beragam komponen seperti matriks ekstraseluler, mediator imunologi, dan jenis leukosit tertentu yang bertugas melawan infeksi dalam luka (Chen dan Linlin, 2018). Dalam kasus luka pada kulit, semakin lama proses penyembuhan memakan waktu maka semakin besar peluang bagi mikroba berbahaya untuk masuk ke dalam tubuh dan menimbulkan risiko infeksi. Adanya sel inflamasi sangat penting untuk memproduksi sitokin-sitokin yang membantu dalam proses penyembuhan luka, serta untuk menarik dan merekrut fibroblas ke dalam area luka. Setelah fase pertama penyembuhan luka yang melibatkan infeksi dan peradangan berangsur-angsur mereda, proses regenerasi pembuluh darah dimulai untuk memperbaiki jaringan epitel (Sorg dan Sorg, 2023). Keefektifan obat topikal sangat dipengaruhi oleh lamanya waktu kontak dengan kulit, sehingga obat perlu memiliki sifat perekat. Selain itu, efektivitas obat topikal juga bergantung pada kemampuannya dalam melepaskan obat secara efektif (Vaou et al., 2021).

World Health Organization (WHO) menyatakan 80% dari negara berkembang masih menggunakan obat tradisional yang berasal dari tanaman herbal. Jumlah total tanaman herbal diperkirakan sekitar 374.000, sedangkan jenis obat yang digunakan oleh manusia yakni sekitar 28.187 (Christenhusz dan Byng, 2016). Ekstrak tumbuhan herbal telah terbukti menunjukkan berbagai aktivitas biologis, termasuk aktivitas antimikroba, antiinflamasi, dan antioksidan (Herdiani et al., 2022). Di beberapa negara berkembang, penduduk seringkali mengandalkan tanaman herbal sebagai sumber utama perawatan kesehatan karena pertimbangan biaya dan ketersediaan yang terjangkau (Ayadi et al., 2020). Salah satu tanaman yang umum digunakan adalah jintan hitam (*Nigella sativa*).

Jintan hitam adalah tanaman tahunan yang tersebar luas terutama di wilayah Afrika Utara, Timur Tengah, Eropa, dan Asia. Selama berabad-abad, jintan hitam telah menjadi bagian dari tradisi kuliner dan pengobatan di negara-negara Arab, subkontinen India, dan Eropa. Tanaman ini berperan penting dalam pengobatan berbagai penyakit, terutama dalam mengatasi asma, peradangan, batuk, dan kondisi flu lainnya. Bijinya juga memiliki berbagai manfaat, termasuk sebagai diuretik dan obat cacing. Dalam tradisi umat Islam, "Habba sawda" seperti yang dikenal dalam bahasa Arab dianggap sebagai obat mujarab yang efektif mengatasi berbagai penyakit (Sardoo et al., 2020).

Para peneliti sebelumnya menghubungkan manfaat kesehatan dari jintan hitam dengan kandungan nutrisi dan bahan aktifnya yang tinggi. Bijinya mengandung sekitar 28 hingga 36% *fixed oil*, protein, alkaloid, dan saponin, serta

sekitar 0,4 hingga 2,5% minyak esensial. Bahan aktif yang sering dilaporkan termasuk *thymoquinone* (TQ), *dithymoquinone*, *thymol*, dan *thymohydroquinone*. Biji ini juga mengandung berbagai komponen nutrisi seperti karbohidrat, lemak, asam amino esensial, dan vitamin. Selain itu, bijinya dianggap sebagai sumber potasium, kalsium, dan zat besi. Penelitian yang luas telah dilakukan oleh beberapa penulis tentang *N. sativa* dan bahan aktifnya yang menunjukkan berbagai sifat farmakologis, termasuk antibakteri, antiinflamasi, penghambat pelepasan histamin, penurun tekanan darah, penurun kadar gula darah, kemampuan pencegahan kanker, dan sifat antioksidan. Kesehatan mulut dan rongga mulut memiliki peran penting dalam kesehatan secara keseluruhan. Penyakit mulut dapat dicegah dengan penggunaan obat herbal selama bertahun-tahun, termasuk menggunakan *Nigella sativa* (Majeed et al., 2021).

Berdasarkan penjelasan yang telah diuraikan, manfaat yang dimiliki oleh tumbuhan herbal ini membuat peneliti tertarik melakukan penelitian yang berhubungan dengan bidang studi yang ditekuni oleh peneliti yakni dalam bidang kedokteran gigi. Maka dari itu, peneliti hendak melakukan penelitian dengan judul "Pengaruh Aplikasi Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) Terhadap Peningkatan Jumlah Fibroblas pada Luka Mukosa Oral Tikus (Studi *In Vivo*)".

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah pada penelitian ini sebagai berikut:

1.2.1. Bagaimana pengaruh aplikasi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap penyembuhan luka mukosa oral tikus?

1.2.2. Bagaimana pengaruh aplikasi ekstrak jintan hitam (Nigella sativa) terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada luka mukosa oral tikus?

1.2.3. Berapa persen kandungan ekstrak jintan hitam (Nigella sativa) yang paling efektif terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada luka mukosa oral tikus?

1.3. Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh aplikasi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dan efektivitas persentase kandungan ekstraknya terhadap penyembuhan luka dan peningkatan jumlah fibroblas pada luka mukosa oral tikus.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Bagi penulis

Peneliti berharap penelitian ini dapat menambah wawasan peneliti terhadap kandungan dan manfaat dari jintan hitam. Peneliti juga berharap penelitian ini dapat menambah pengalaman peneliti dalam melakukan penelitian serta menjadi gambaran mengenai aktivitas-aktivitas yang dilakukan dalam penelitian eksperimental laboratoris. Dengan demikian, mampu meningkatkan minat peneliti untuk menjadi *future researcher* dan melanjutkan studi ke jenjang yang lebih tinggi.

1.4.2. Bagi institusi pendidikan

Hasil penelitian diharapkan dapat dikembangkan dalam bidang kedokteran gigi dan dapat menjadi bahan bacaan serta acuan bagi penelitian selanjutnya. Penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan data ilmiah yang dapat mendukung penggunaan dan pengembangan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) sebagai bahan herbal yang bermanfaat bagi penyembuhan luka.

1.4.3. Bagi masyarakat

Dapat memberikan informasi mengenai kegunaan jintan hitam dalam proses penyembuhan luka dalam rongga mulut sehingga dapat menjadi pilihan obat herbal.

1.5. Studi teori

1.5.1. Fase penyembuhan luka (*wound healing*)

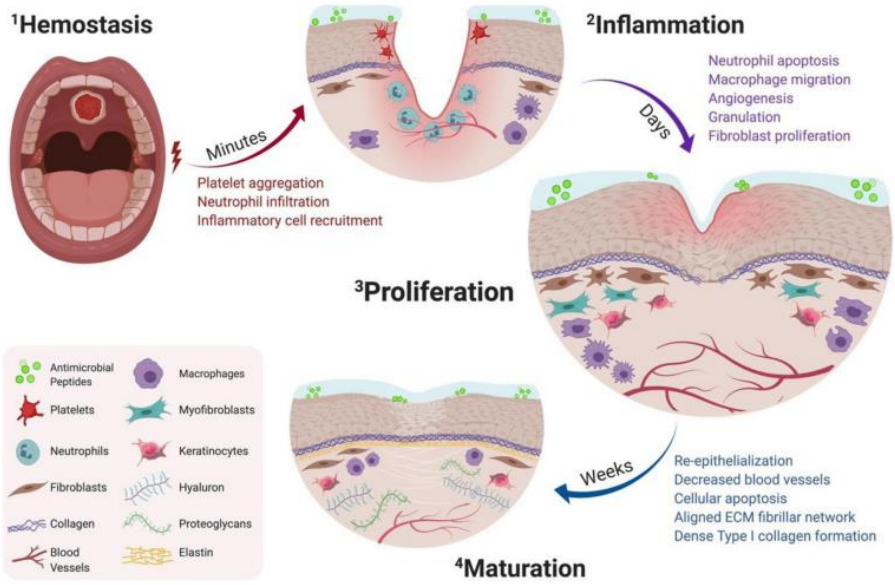
1.5.1.1. Fase hemostatik

Saat mengalami luka, pembuluh darah yang rusak berkontraksi dengan cepat dan membentuk bekuan darah (*clot*) yang mencegah keluarnya darah dari kerusakan yang terjadi pada pembuluh darah. Trombosit merupakan kontributor utama hemostasis dan koagulasi. Sel ini diaktifkan ketika bertemu dengan matriks subendotel vaskular. Reseptor trombosit (misalnya glikoprotein VI) berinteraksi dengan protein *extracellular matrix* (ECM) (misalnya thrombin, fibronektin, kolagen, dan faktor von Willebrand) sehingga meningkatkan kekakuan pada dinding pembuluh darah (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Trombin kemudian memicu aktivasi trombosit, menginduksi perubahan konformasi, dan butiran molekul bioaktif yang meningkatkan koagulasi. Bekuan tidak larut (*eschar*) yang terdiri dari fibrin, fibronektin, vitronektin, dan trombospondin berfungsi untuk menyumbat luka dan mencegah perdarahan. *Eschar* juga memenuhi sejumlah fungsi sekunder, termasuk melindungi terhadap invasi bakteri, menyediakan perancah bagi sel-sel kekebalan yang masuk dan menyimpan cadangan sitokin dan faktor pertumbuhan untuk memandu perilaku sel-sel luka dalam perbaikan awal. Setelah itu, peran penting dalam fase hemostasis ini akan dijalankan oleh trombosit (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Trombosit berperan dalam memberi sinyal kepada sel-sel kekebalan tubuh untuk bermigrasi ke tempat luka, baik dengan menangkap langsung sel-sel kekebalan dalam eschar, atau dengan melepaskan kemokin dari sekretomnya saat degranulasi. Sekretom trombosit juga mengandung faktor pertumbuhan yang merangsang pertumbuhan sel-sel kulit, seperti fibroblas dan keratinosit. Sebagai jenis sel yang paling melimpah selama tahap awal penyembuhan, trombosit memiliki peran aktif dalam menghambat infeksi bakteri pada tahap awal invasi. Sel ini mengekspresikan berbagai reseptor seperti tol (TLRs), yang mengatur produksi peptida antimikroba. Setelah pembekuan yang memadai terbentuk, proses koagulasi dihentikan untuk mencegah trombosis yang berlebihan. Hal ini dicapai dengan menghambat agregasi trombosit oleh prostasilin, menginaktifkan trombin dengan antitrombin III, dan mendegradasi

faktor koagulasi V dan VII dengan protein C yang diaktifkan. Sementara itu, dinding pembuluh darah yang terluka diperbaiki oleh sel otot polos dan sel endotel yang berkembang biak sebagai tanggapan terhadap pelepasan faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit (PDGF). Sel endotel yang lebih matang juga dapat direkrut untuk membantu proses ini karena mereka memiliki kemampuan terbatas untuk proliferasi (Wilkinson dan Hardman, 2020).



Gambar 1. Tahap penyembuhan luka (Wilkinson dan Hardman, 2020)

1.5.1.2. Fase inflamasi

Inflamasi bawaan berkembang sebagai sistem pertahanan utama terhadap invasi patogen pada luka. Respon imun ini dimulai oleh sinyal yang dihasilkan oleh pola molekuler terkait kerusakan (DAMPs) yang dilepaskan oleh sel-sel nekrotik dan jaringan yang terluka, serta pola molekuler terkait patogen (PAMPs) yang berasal dari komponen bakteri. PAMPs dan DAMPs ini mengaktifkan sel-sel imun yang berada di lokasi, seperti sel mast, sel Langerhans, sel T, dan makrofag, melalui pengenalan pola reseptor, yang kemudian menginisiasi jalur inflamasi. Pelepasan sitokin dan kemokin pro-inflamasi kemudian menarik leukosit yang bersirkulasi ke lokasi luka. Molekul pro-inflamasi juga memicu vasodilatasi, bersama dengan ekspresi molekul adhesi sel endotel seperti selektin, memfasilitasi adhesi dan migrasi neutrofil dan monosit melalui pembuluh darah (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Neutrofil diarahkan menuju luka dari pembuluh darah yang terluka, ditarik oleh zat kemoatraktan seperti interleukin 1 (IL-1), *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-α), dan endotoksin bakteri seperti lipopolisakarida (LPS). Neutrofil melepaskan sitokinnya sendiri sebagai respon terhadap sinyal pro-inflamasi dan aktivasi jalur sinyal inflamasi seperti NF-κB. Neutrofil bertugas membersihkan

jaringan nekrotik dan patogen melalui fagositosis serta pelepasan spesies oksigen reaktif (ROS), peptida antimikroba, eikosanoid, dan enzim proteolitik. Selain itu, sel-sel ini juga mampu menangkap dan menghancurkan patogen dalam perangkap ekstraseluler yang terdiri dari jaringan DNA yang dilapisi dengan peptida antimikroba dan histon sitotoksik (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Makrofag yang teraktivasi diinduksi oleh rangsangan proinflamasi seperti LPS dan interferon-gamma (IFN-γ). Peristiwa ini memicu reaksi peradangan dengan melepaskan ROS, sitokin inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF-α, serta faktor pertumbuhan seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *platelet-derived growth factor* (PDGF). Makrofag menggantikan neutrofil yang mengalami apoptosis, menjadi mediator utama dalam proses peradangan. Tahap peradangan berikutnya ditandai dengan peralihan ke aktivasi alternatif, yang terjadi melalui diferensiasi monosit yang baru direkrut atau melalui transformasi makrofag yang ada menjadi fenotipe anti-inflamasi. Meskipun tidak banyak diketahui, perubahan fenotipik ini bisa dipicu oleh perubahan lingkungan dalam konsentrasi sitokin serta proses eferositosis. Selain itu, perubahan ini juga bisa dipengaruhi oleh miRNA, faktor transkripsi, serta modulasi reseptor pro-inflamasi dan anti-inflamasi (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Kehadiran neutrofil dan makrofag dalam jumlah besar jumlah besar di area luka dapat melemahkan peran penting sel myeloid lain dalam proses penyembuhan. Namun, penelitian terbaru menunjukkan sel T residen memiliki peran yang sangat signifikan dalam respons awal terhadap cedera, sementara sel T yang beredar dalam darah direkrut untuk mengelola inflamasi. Tikus yang lebih tua dan menderita diabetes mengalami penurunan jumlah sel T dendritik epidermal serta mengalami keterlambatan dalam proses penyembuhan, sementara pemberian sel T dendritik epidermal secara subkutan dapat mempercepat proses penyembuhan. Penghapusan sel T pengatur anti-inflamasi juga dapat menyebabkan penundaan dalam perbaikan jaringan pada tikus. Selain itu, sel mast juga memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka, dengan melepaskan histamin yang membantu dalam rekrutmen neutrofil selama fase awal peradangan (Wilkinson dan Hardman, 2020).

1.5.1.3. Fase proliferasi

Tahap proliferatif dalam proses penyembuhan ditandai oleh aktivasi yang luas dari keratinosit, fibroblas, makrofag, dan sel endotel untuk mengelola penutupan luka, penambahan matriks, dan pembentukan pembuluh darah baru. Dalam 12 jam pertama setelah cedera, keratinosit diaktifkan oleh berbagai faktor seperti perubahan tegangan mekanik, gradien listrik, serta paparan hidrogen peroksida, patogen, faktor pertumbuhan, dan sitokin. Aktivasi ini mengarah pada transisi parsial keratinosit menjadi sel epitel-mesenkim, memungkinkan mereka untuk menjadi lebih invasif dan bergerak menuju tepi luka (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Pembentukan pembuluh darah baru selama proses angiogenesis sangat penting untuk menyediakan nutrisi kepada jaringan penyembuhan yang sangat aktif secara proliferasi. Angiogenesis yang diinduksi oleh kondisi hipoksia memicu ekspresi *hypoxia-inducted factors* (HIFs) dan siklooksigenase 2 (COX-2) sehingga memicu pelepasan VEGF dan faktor-faktor lainnya. Sebagai respon terhadap sinyal ini, sel-sel endotel mikrovaskular berkembang biak dan bergerak ke dasar luka, membentuk pembuluh darah baru yang menyatu dengan yang sudah ada, membentuk jaringan pembuluh darah yang stabil. VEGF membantu mencegah apoptosis sel endotel dengan meningkatkan ekspresi protein anti-apoptosis seperti BCL-2, sementara matriks fibrin merangsang angiogenesis dengan merangsang perubahan fenotipik pada sel endotel, mendorong migrasi mereka (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Peran yang sangat penting dalam proses angiogenesis dimiliki oleh makrofag. Sel ini membantu mengatur perilaku sel endotel mikrovaskular. Makrofag menghasilkan enzim protease seperti MMP untuk mengurai jaringan fibrin yang padat serta faktor kemotaktik seperti TNF-α, VEGF, dan TGF-β untuk merangsang migrasi sel endotel. Faktor turunan makrofag sangat pentingnya dalam angiogenesis yakni dalam penghilangan VEGF-A yang spesifik untuk myeloid mengurangi pembentukan kapiler pada luka tikus. Selain itu, makrofag juga turut serta dalam proses perombakan pembuluh darah baru, dengan menyatukan ujung-ujung pembuluh darah, menyerap pembuluh darah yang berlebihan, dan meredam respons angiogenik untuk mencegah vaskularisasi yang berlebihan (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Kulit memiliki jaringan saraf sensorik dan otonom yang penting untuk sensasi dan motorik. Oleh karena itu, regenerasi serat saraf sangatlah krusial cedera. Peran utama dalam fase proliferasi ini dimainkan oleh sistem mikro dan makrovaskular. Makrofag tidak hanya berperan dalam hemostasis awal, mengurangi kehilangan darah, dan membentuk matriks luka sementara, tetapi juga menyediakan sitokin dan *growth factor* dari *blood clot*. Lingkungan mikro luka yang sementara adalah titik awal bagi pembentukan pembuluh darah baru dan memastikan pemulihan aliran darah yang diperlukan untuk menyediakan oksigen dan nutrisi serta untuk menjaga metabolisme sel dan proses penyembuhan (Wilkinson dan Hardman, 2020).

1.5.1.4. Fase *remodelling*

Remodeling matriks ekstraseluler (ECM) mencakup rangkaian respon terhadap cedera yang dimulai dengan pembekuan fibrin dan berakhir dengan pembentukan jaringan parut matang yang kaya akan kolagen tipe I. Fibroblas menjadi sel utama yang bertanggung jawab atas remodeling ECM luka, menggantikan bekuan fibrin awal dengan hyaluronan, fibronektin, dan proteoglikan, serta membentuk fibril kolagen matang yang kemudian direkonstruksi. Proteoglikan membantu dalam pembentukan fibril kolagen yang matang dan berikatan silang, serta bertindak sebagai jalur migrasi sel. Biasanya, kolagen pada kulit dewasa yang tidak terluka terdiri sekitar 80% dari tipe I dan

10% dari tipe III. Namun, jaringan granulasi, yang merupakan tahap awal penyembuhan luka, terutama mengandung kolagen tipe III terkait dengan embrio (sekitar 30%) dan hanya 10% dari kolagen tipe I (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Selama proses penyembuhan, kolagen tipe III akan digantikan oleh kolagen tipe I yang secara langsung meningkatkan kekuatan tarik jaringan parut yang terbentuk. Walaupun demikian, integritas dan struktur ECM jaringan parut tidak akan kembali sepenuhnya seperti kulit yang tidak pernah terluka. Fibril kolagen dalam dermis bekas luka umumnya mengadopsi ikatan paralel yang lebih besar, berbeda dengan fibril kolagen dalam kulit yang tidak terluka yang biasanya memiliki orientasi anyaman keranjang. Dengan demikian, jaringan parut dari bekas luka hanya memberikan sekitar 80% kekuatan yang dimiliki kulit sebelum terluka (Wilkinson dan Hardman, 2020).

Proses penyembuhan luka berlangsung lebih lambat seiring bertambahnya usia. Hal ini dapat disebabkan oleh kerusakan kohesi keratinosit dari kelenjar keringat ekrin pada kulit yang mengalami penuaan. Meskipun kepadatan kelenjar keringat ekrin sama pada kulit yang tua dibandingkan dengan kulit yang muda, aktivitasnya dalam membentuk pertumbuhan epitel selama perbaikan kulit menurun hingga 50% (Wilkinson dan Hardman, 2020).

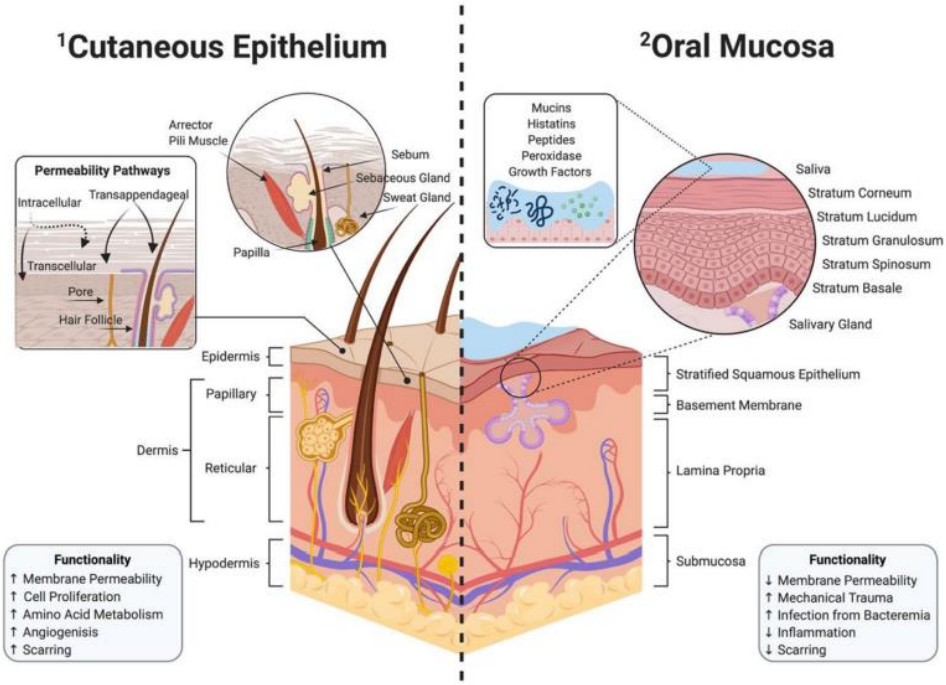
1.5.1.5. Perbedaan Penyembuhan Luka Kutan dan Mukosa

Berdasarkan struktur jaringan secara umum, kulit yang sehat dan mukosa mulut memiliki banyak kesamaan tetapi memiliki perbedaan histologis yang mendasar. Keduanya terdiri dari epitel berlapis yang mengandung keratinosit, melanosit, sel Merkel, dan sel Langerhans, yang bertanggung jawab untuk melindungi tubuh dari kehilangan cairan, paparan toksin, dan serangan mikroba. Meskipun kulit dan mukosa mulut memiliki fungsi dan struktur yang serupa, terdapat perbedaan dalam kondisi homeostatis yang penting untuk diperhatikan ketika membandingkan proses penyembuhan di kedua jaringan tersebut. Sebagai contoh, epitel mulut umumnya lebih tebal daripada kulit. Mukosa palatum dan bukal memiliki lebih banyak lapisan sel dan tingkat proliferasi yang lebih tinggi pada lamina basal dibandingkan dengan kulit (masing-masing 20–30 berbanding 5–8 lapisan sel hidup). Meskipun seluruh epidermis mengalami proses keratinisasi, ada perbedaan yang signifikan di dalam mulut antara epitel terkeratinisasi pada palatum dan gingiva yang harus menahan tekanan mekanis saat mengunyah dengan epitel mukosa bukal yang tidak terkeratinisasi yang memiliki fleksibilitas untuk meregang dan menahan gaya kompresi (Waasdorp et al., 2021).

Epitel kulit terdiri dari tiga lapisan berbeda yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis. Kulit dapat memanfaatkan rute tambahan untuk meningkatkan permeabilitas transkutan melalui jalur intraseluler, transeluler, dan transappendageal menggunakan pori-pori dan folikel rambut. Sebaliknya, mukosa mulut terdiri dari epitel skuamosa berlapis, diikuti oleh membran basal, lamina propria, dan submukosa. Khusus untuk lingkungan mulut, saliva

mengandung musin, histatin, peptida, peroksidase, dan faktor pertumbuhan yang berperan dalam homeostasis mulut. Mukosa mulut yang terluka rentan terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteremia, karena mikroflora mulut yang kompleks dengan jutaan mikroorganisme (Waasdorp et al., 2021).

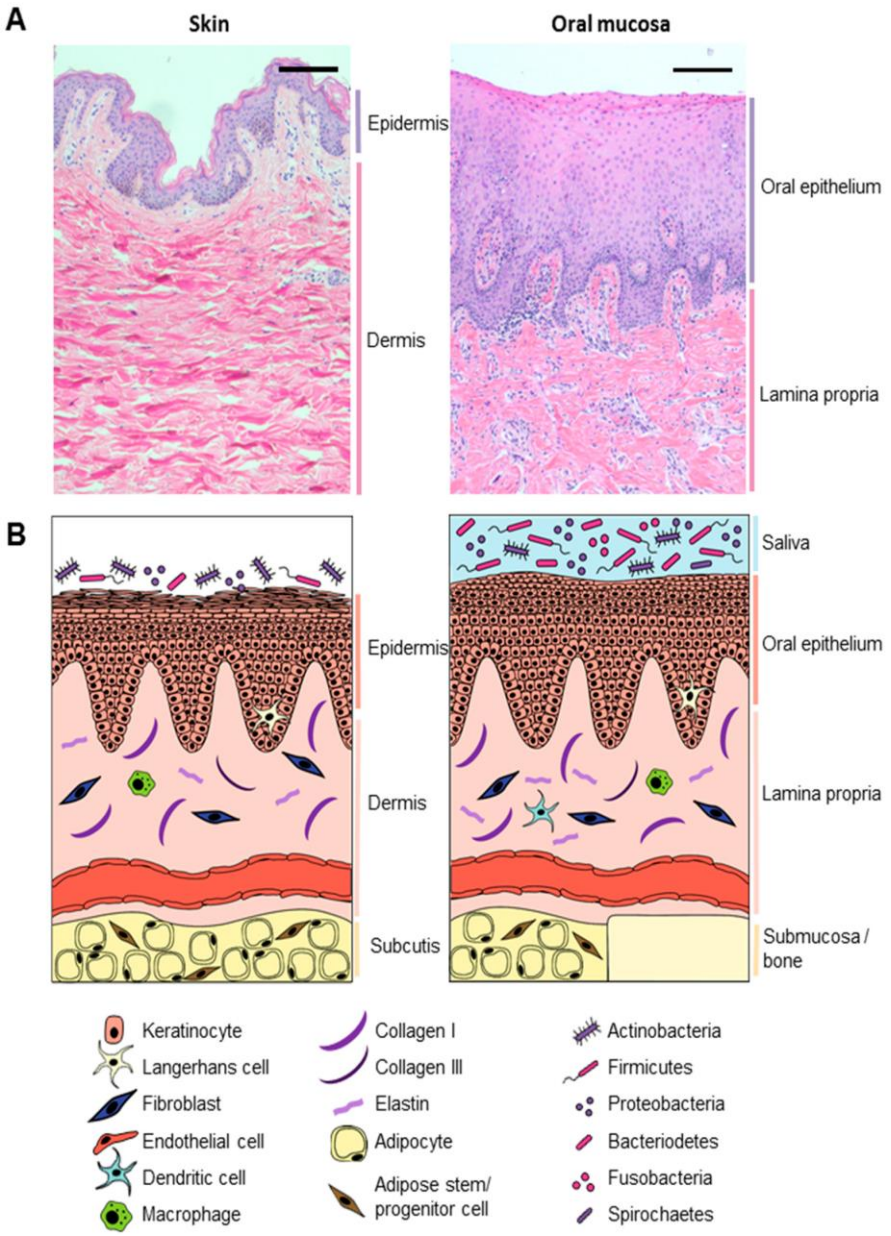
Luka pada bagian dalam mulut sembuh dengan cepat dan meninggalkan jaringan parut minimal meskipun terpapar terus-menerus oleh gerakan, tekanan, gesekan mekanis, dan berbagai jenis mikroba. Literatur terbaru menunjukkan kemungkinan bahwa beberapa mikroba dapat memberikan kontribusi positif terhadap proses penyembuhan luka dengan merangsang sistem kekebalan tubuh atau memengaruhi serangkaian reaksi yang terlibat dalam proses penyembuhan. Seperti halnya pada kulit, komplikasi seperti penyakit autoimun (seperti pemfigoid sikatrik, pemfigus vulgaris) atau diabetes dapat menghambat proses penyembuhan luka dan meningkatkan risiko jaringan parut di dalam mulut. Faktor lingkungan seperti konsumsi alkohol dan paparan asap rokok juga telah terbukti mengganggu proses penyembuhan luka di dalam mulut (Waasdorp et al., 2021).



Gambar 2. Perbandingan kulit dan mukosa sehat A) Tampakan histologis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan). Rasio 100 mikrometer. B) Ilustrasi grafis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan) (Wilkinson dan Hardman, 2020)

Terdapat perbedaan intrinsik antara kulit dan mukosa mulut yang berkaitan dengan lingkungan yang berbeda. Misalnya, kulit terpapar di lingkungan dengan udara serta perubahan suhu dan kelembapan yang

berlangsung terus-menerus sedangkan mukosa mulut berada dalam lingkungan hangat dan lembap secara konsisten yang menciptakan kondisi ideal bagi berbagai mikroba. Mukosa mulut juga mampu menahan abrasi mekanis yang kuat dan paparan berulang terhadap peptida, protein, dan antigen dari makanan. Berbagai zat yang berinteraksi langsung dengan kulit dan mukosa, seperti keringat, minyak, udara kering, lendir, atau air liur, semuanya memiliki perbedaan dalam pH, komposisi, dan fungsi yang berdampak pada proses penyembuhan luka dengan cara yang berbeda. Misalnya, proses penyembuhan luka pada kulit akan dipercepat dalam lingkungan yang lembab, yang mendukung re-epitelialisasi, angiogenesis, dan maturasi luka. Saliva tidak hanya memberikan lingkungan yang lembab secara alami di rongga mulut selama penyembuhan luka, tetapi juga mengandung berbagai peptida dan protein seperti faktor pertumbuhan (seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Vascular Endotel Growth Factor* (VEGF), dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF)) serta histatin yang merangsang proses penyembuhan luka (Waasdorp et al., 2021).



Gambar 3. Perbandingan kulit dan mukosa sehat A) Tampakan histologis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan). Rasio 100 mikrometer. B) Ilustrasi grafis antara kulit sehat (kiri) dan mukosa oral (kanan) (Toma et al., 2021)

1.5.2. Jintan hitam (Nigella sativa)

1.5.2.1. Pengertian jintan hitam (*Nigella sativa*)

a) b)

Gambar 4. a) Bunga jintan hitam dan b) biji jintan hitam

Nigella sativa atau yang biasa disebut sebagai jintan hitam merupakan tanaman herbal yang berasal dari famili *Ranunculaceae.* Tanaman ini tumbuh baik di daerah tropis dan subtropis. Tinggi tanaman mencapai 20–60 cm dengan bentuk daun menyerupai benang dan menghasilkan bunga halus yang mengandung banyak biji. Tanaman ini merupakan tanaman herbal dengan karakteristik yang tegak dan bercabang, memiliki sistem akar tunggang, daun yang terbelah dan bunga dengan warna menarik mulai dari warna kuning hingga putih. Pada umumnya, bunga tanaman ini berbentuk *pentamerous* (kelipatan 5) kecuali benang sarinya yang jumlahnya banyak (Sardoo et al., 2020).

Di Asia, Eropa, Timur Tengah, dan negara-negara Mediterania lainnya, *N. sativa* telah dibudidayakan secara teratur dan melimpah untuk berbagai tujuan. Tanaman ini umumnya dibudidayakan pada musim semi dan dipanen pada musim gugur, meskipun mungkin terjadi sedikit variasi dalam pola budidayanya yang bergantung pada lokasi geografis. Total lama waktu pembudidayaan *N. sativa* mulai dari penanaman hingga panen pada umumnya dibutuhkan waktu selama enam bulan. Tanaman ini utamanya dibudidayakan untuk diambil bijinya yang digunakan sebagai rempah-rempah, bahan penyedap, dan pengobatan, terutama di Asia Selatan (Majeed et al., 2021).

1.5.2.2. Taksonomi jintan hitam (*Nigella sativa*)

Tabel 1. Taksonomi Jintan Hitam (*Nigella sativa*) (Majeed et al., 2021).

Klasifikasi Ilmiah	
Kingdom	Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	Tracheobionata
Kelas	Spermatophyta
Orde	Ranunculales
Famili	Buttercup
Genus	*Nigella*
Spesies	*sativa*

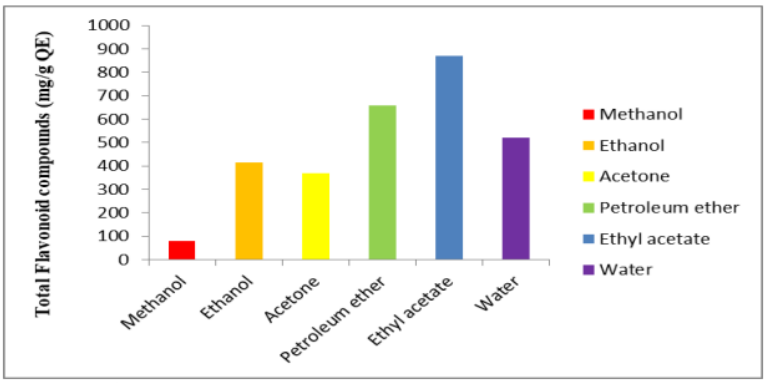
1.5.2.3. Komposisi jintan hitam (*Nigella sativa*)

Penelitian eksperimental menemukan keberadaan zat bioaktif dalam ekstrak jintan hitam yang memiliki sifat anti-mikroba, seperti tanin, terpenoid, steroid, saponin, alkaloid, senyawa fenolik, dan flavonoid. Evaluasi ini juga mengungkapkan bahwa keberadaan fitokonstituen dalam ekstrak biji *Nigella sativa L*. mendukung aktivitas antibakterinya terhadap bakteri yang diuji, meskipun efektivitasnya lebih tinggi terhadap bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Dalli et al., 2022).

Tabel 2. Komposisi Jintan Hitam (*Nigella sativa*) (Ahmad et al., 2021)

Kelompok	Konsentrasi	Subkelompok	Komponen
Fixed Oil	32-40%	Asam lemak jenuh	Asam palmitat (12,5%), asam stearate dan miristat (30%)
		Asam lemak tak jenuh	Arachidonic, asam eicosadienoic (3%), Linoleic (50-60%), Linolenat, Asam Oleat (20%),
Volatile Oil	0,4-0,45%		Nigellone, Thymoquinone (30- 40%), Thymohydroquinone, Dithymoquinone, Thymol
Proteins	16-19,9%	Asam amino	Arginine, Glutamic acid, Leucine, Lysine, Methionine, Tyrosine, Proline dan Threonine
Minerals	1,79-3,74%		Cu, P, Zn, Fe dan sebagainya
Karbohidrat	33,9%		
Fiber	5,5%		
Water	6%		
Komposisi kimia lain			Nigellone, Avenasterol-5-Ene, Avenasterol- 7c-Ycelnoee,

Kaushik dan Barmanray (2022), menyimpulkan ekstrak etil asetat *N. sativa* memiliki kandungan flavonoid tertinggi (870,0 mg/g QE) dibandingkan pelarut lain seperti methanol, ethanol, aseton, dan lainnya. Derivat flavonoid yang berasal dari *N. sativa* dikenal sebagai *thymoquinone* (Mekhemar et al., 2020). *Thymoquinone* sebagai komponen bioaktif utama dalam *N. sativa* memiliki sejumlah manfaat penting. Berbagai penelitian menunjukkan efek antimikroba, anti-inflamasi, anti-alergi, antioksidan, anti-neoplastik, dan anti-diabetes. *Thymoquinone* telah terbukti secara signifikan mengurangi kerusakan jaringan yang disebabkan oleh reperfusi iskemia serta menunjukkan aktivitas antimikroba dan kemampuannya dalam memodifikasi resistensi terhadap patogen (Kmail et al., 2023).



Gambar 5. Total senyawa Flavonoid ekstrak biji jintan hitam (Kaushik dan Barmanray, 2022)

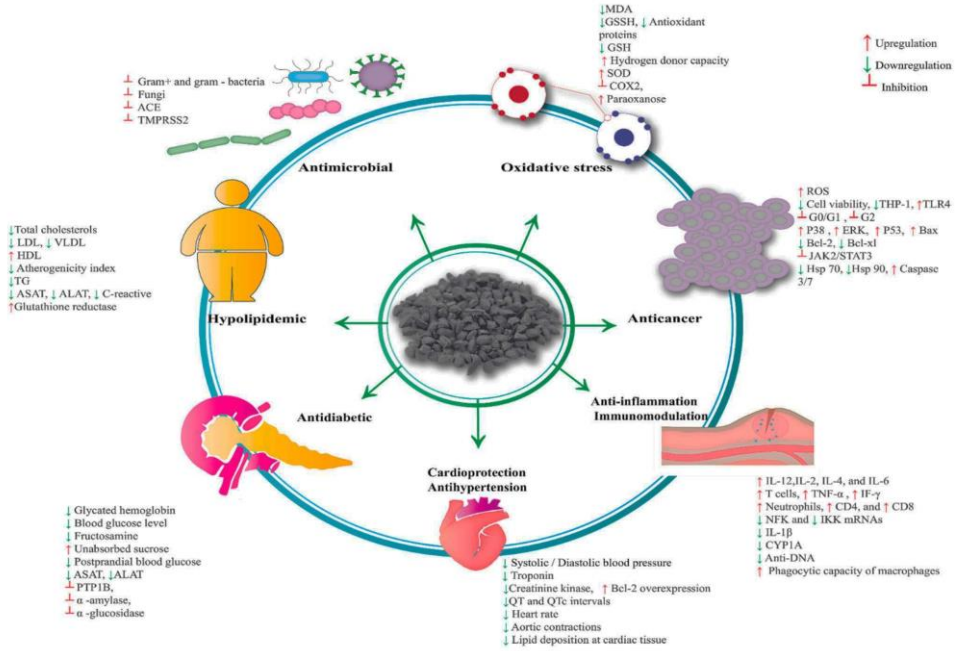
1.5.2.4. Manfaat jintan hitam (*Nigella Sativa*)

Nigella sativa telah menjadi bagian yang tidak terpisahkan dari dunia kuliner dan pengobatan tradisional di berbagai negara dan budaya. Tanaman ini telah diakui dan diwariskan dalam berbagai sistem pengobatan seperti Unani, pengobatan tradisional Afrika dan Timur, pengobatan Arab, Cina, dan Ayurveda sebagai pengobatan untuk berbagai penyakit dan tonik umum. Tanaman yang biasa disebut dengan nama “Habbatussauda” ini dapat dimanfaatkan baik secara langsung sebagai bahan aktif dalam obat herbal maupun sebagai ramuan teh. Penelitian pada biji *N. sativa* menunjukkan efektivitasnya dalam menangani masalah seperti diabetes, hipertensi, stres oksidatif, epilepsi, gangguan lambung, asma, peradangan, hati berlemak, kanker, dan radang sendi pada berbagai model organisme dan manusia (Huwait et al., 2022).

Senyawa fitokimia utama dalam *N. sativa* yaitu *thymoquinone* diakui luas karena memiliki khasiat obat yang sangat luas. Di Pakistan, tanaman ini secara rutin dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional Unani. Dalam konteks promosi kesehatan dan pengendalian penyakit, diperlukan usaha besar untuk merubah pendekatan terhadap pengobatan herbal dan lokal serta memaksimalkan pemanfaatan tanaman ini dalam praktik pengobatan modern. Gambar dibawah ini menunjukkan rangkuman pemahaman terkini mengenai potensi obat *N. sativa* dalam kerangka sistem pengobatan tradisional dan peluang pemanfaatannya dalam pengobatan modern (Figlon et al., 2023).

Kandungan nutrisi dan bahan aktif yang tinggi pada jintan hitam berdampak pada manfaatnya yang meluas. Bijinya mengandung sekitar 28 hingga 36% *fixed oil*, protein, alkaloid, dan saponin, serta sekitar 0,4 hingga 2,5% minyak esensial. Bahan aktif yang sering dilaporkan termasuk *thymoquinone* (TQ), *dithymoquinone*, *thymol*, dan *thymohydroquinone*. Biji ini juga mengandung berbagai komponen nutrisi seperti karbohidrat, lemak, asam amino esensial, dan vitamin. Selain itu, bijinya dianggap sebagai sumber potasium, kalsium, dan zat besi. Penelitian yang luas telah dilakukan oleh beberapa penulis

tentang *N. sativa* dan bahan aktifnya yang menunjukkan berbagai sifat farmakologis, termasuk antibakteri, anti inflamasi, penghambat pelepasan histamin, penurun tekanan darah, penurun kadar gula darah, kemampuan pencegahan kanker, dan sifat antioksidan (Soltanfar et al., 2023). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Setiawatie et.al. (2022), menemukan pasta gigi yang mengandung *N. sativa* menunjukkan efek anti-destruktif pada matriks ekstraseluler periodontal. Oleh karena itu, pasta gigi *N. sativa* memiliki potensi untuk digunakan dalam manajemen periodontitis.

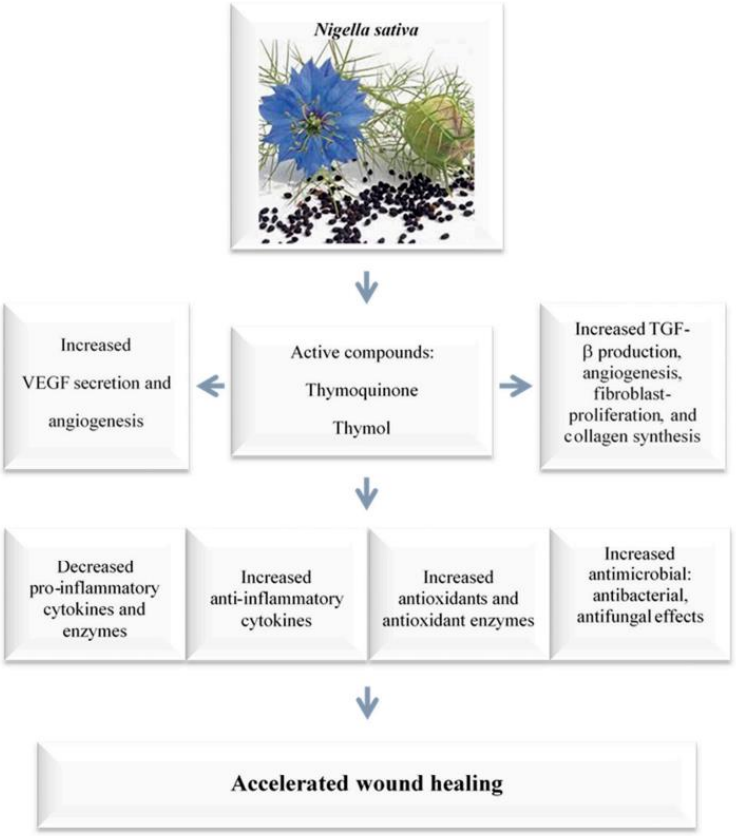


Gambar 6. Manfaat jintan hitam

Manfaat *thymoquinone* sebagai bahan senyawa aktif utama pada *Nigella sativa* terhadap proses penyembuhan luka kulit terutama disebabkan oleh peningkatan angiogenesis, efek antiinflamasi, antioksidan, dan antibakteri, serta stimulasi proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen. Semua proses ini bekerja bersama untuk mempercepat penyembuhan luka kulit. *Thymoquinone* telah terbukti secara signifikan mengurangi kerusakan jaringan akibat reperfusi iskemia yakni suatu kondisi di mana aliran darah terhenti sementara sebelum dikembalikan ke organ atau jaringan. Selain itu, *thymoquinone* juga memiliki sifat antibakteri dan mengubah resistensi terhadap berbagai infeksi. Penelitian oleh Selcuk et al. (2013), pada model tikus menunjukkan bahwa kemampuan penyembuhan luka *thymoquinone* disebabkan oleh efek anti-mikroba, perubahan resistensi, antioksidan, dan antiinflamasi. Penggunaan *thymoquinone* secara topikal pada luka terbukti efektif karena memungkinkan penetrasi langsung ke area yang terkena. Meskipun demikian, terapi dengan *thymoquinone* terbatas karena daya larut air yang rendah, penetrasi kulit yang

rendah, dan ketersediaan sistemik yang terbatas. Walaupun memiliki keterbatasan ini, *thymoquinone* menjanjikan untuk digunakan dalam aplikasi medis karena aktivitasnya yang multifungsi (Kmail et al., 2023).

Selain itu, *thymoquinone* juga memiliki kemampuan untuk menghentikan dan membalikkan penurunan jumlah leukosit dan kadar imunoglobulin yang diinduksi oleh pestisida, karena meningkatkan aktivasi fagositik dengan merangsang makrofag. Studi ini menyoroti karakteristik *thymoquinone* sebagai agen imunomodulator, yang mampu merangsang kekebalan tubuh melalui aktivasi sel-sel kekebalan. Meskipun belum ada hubungan langsung antara *thymoquinone* dan kekebalan terhadap kanker, penelitian ini menekankan sifat imunomodulator *thymoquinone* dan potensi sebagai agen imunoterapi (Kmail et al., 2023).



Gambar 7. Mekanisme penyembuhan luka N. sativa dan *thymoquinone*. Efek positif thymoquinone pada penyembuhan luka kulit terutama berasal dari efek antibakterinya, induksi angiogenesis, anti-inflamasi, dan sifat antioksidan serta peningkatan proliferasi fibroblas (Kmail et al., 2023).

1.5.2.5. Kontrol positif dan kontrol negatif

Menurut panduan *dari World Health Organization* (WHO), irigasi menggunakan povidon-iodin lebih efektif dalam proses penyembuhan luka daripada irigasi dengan larutan normal saline. Dalam pengujian efek penyembuhan luka ini, dilakukan penggunaan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang dipakai adalah povidone iodine, yang berfungsi sebagai pembanding efek obat penyembuhan luka terhadap gel ekstrak yang diuji, dalam hal ini ekstrak dari tanaman Nigella sativa. Kontrol positif ini membantu dalam membandingkan jumlah fibroblas selama proses penyembuhan luka. Penanganan luka seringkali melibatkan penggunaan antiseptik seperti Betadine® yang mengandung *povidone iodine* 10%. Meskipun demikian, *povidone iodine* 10% yang terkandung dalam Betadine® tetap menjadi opsi yang layak untuk perawatan luka karena kemudahannya dalam penggunaan, ketersediaan yang luas, dan harganya yang terjangkau. Namun, perlu diingat bahwa bahan antiseptik yang terkandung dalam *povidone iodine* dapat dianggap sebagai benda asing oleh tubuh karena komposisi dan strukturnya berbeda dengan sel-sel tubuh. Sementara itu, kontrol negatif digunakan untuk menilai apakah pelarut memiliki pengaruh terhadap penyembuhan luka pada hewan uji. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa efek yang ditunjukkan oleh ekstrak dan fraksi berasal dari zat yang terkandung dalam sampel dan bukan dari pelarut yang digunakan. Alasan penggunaan *aquades* sebagai kontrol negatif adalah karena senyawa dalam *aquades* bersifat netral dan tidak akan memberikan efek pada penyembuhan luka, atau tidak memiliki aktivitas antiinflamasi (Cahya et al., 2020).

1.5.3. Inflamasi

1.5.3.1. Definisi inflamasi

Inflamasi ("*Inflammation*", dalam Bahasa Indonesia berarti "Peradangan") adalah proses yang sangat dinamis yang dapat dianggap sebagai respons perlindungan pertama dari sistem kekebalan tubuh. Proses ini bertujuan sebagai perlindungan terhadap invasi mikroba, masuknya antigen, cedera atau kerusakan sel dan jaringan. Respon inflamasi yang berhasil dan terkontrol merupakan proses yang berguna untuk menghilangkan rangsangan yang merugikan dan mengembalikan fisiologi normal yang diatur secara akurat oleh kaskade molekuler yang kompleks. Ketidaksempurnaan respon inflamasi dapat menyebabkan morbiditas dan memperpendek umur. Tingkat respon inflamasi sangat penting, karena jika peradangan akut gagal mengatur stimulus pro-inflamasi, hal ini menyebabkan peradangan kronis, autoimunitas dan kerusakan jaringan yang berlebihan (Toma et al., 2021).

1.5.3.2. Etiologi dan patomekanisme inflamasi

Berbagai faktor patogen, seperti infeksi, cedera jaringan, atau infark jantung, dapat menyebabkan peradangan dengan menyebabkan kerusakan jaringan. Etiologi peradangan dapat menular atau tidak menular. Dalam menanggapi

cedera jaringan, tubuh memulai aliran sinyal kimia yang merangsang respons yang bertujuan untuk menyembuhkan jaringan yang terkena. Sinyal- sinyal ini mengaktifkan kemotaksis leukosit dari sirkulasi umum ke lokasi kerusakan. Leukosit yang teraktivasi ini menghasilkan sitokin yang menginduksi respon inflamasi (Toma et al., 2021).

Tabel 3. Etiologi inflamasi

Faktor Non-Infeksius	Faktor Infeksius
Fisik: luka bakar, radang dingin, luka fisik, benda asing, trauma, radiasi sinar matahari Bahan kimia: glukosa, asam lemak, racun, alkohol, bahan kimia pengiritasi (termasuk fluorida, nikel) Biologis: sel yang rusak	Bakteri Virus Mikroorganisme lainnya

1.5.3.3. Tanda-tanda inflamasi

Pada tingkat jaringan, peradangan ditandai dengan kemerahan, bengkak, panas, nyeri, dan hilangnya fungsi jaringan, yang diakibatkan oleh respons sel imun, pembuluh darah, dan inflamasi lokal terhadap infeksi atau cedera Peristiwa mikrosirkulasi penting yang terjadi selama proses inflamasi meliputi perubahan permeabilitas pembuluh darah, rekrutmen dan akumulasi leukosit, dan pelepasan mediator inflamasi. Komponen-komponen sistem tersusun dan terorganisir membentuk struktur khusus yang mendukung fungsi tertentu. Pengaturan fungsi ini dilakukan sesuai dengan prinsip-prinsip sistem seperti pertumbuhan, stabilitas, atau koordinasi. Gangguan pada salah satu aspek ini dapat menghasilkan tiga masalah umum dalam sistem: kehilangan regulasi, kehilangan fungsi, atau kehilangan struktur (Toma et al., 2021).

Ketiga ciri tersebut diperlukan untuk fungsi dan regulasi jaringan. Hilangnya struktur tertentu berarti hilangnya fungsi struktur tersebut sehingga mengakibatkan hilangnya regulasi struktur yang berkaitan. Dalam sistem biologis, ketiga jenis masalah tersebut dapat terjadi sebagai respons terhadap gangguan lingkungan atau internal yang berbeda, dan ketiganya dapat menimbulkan respons inflamasi protektif. Respon-respon ini melengkapi, meningkatkan, atau memodifikasi fitur-fitur struktural, fungsional, dan peraturan normal dari sistem untuk mengoptimalkan pertahanan terhadap gangguan-gangguan luar. Istilah “inflamasi” digunakan dalam arti luas sebagai proses apa pun yang melibatkan sinyal dan sel yang diketahui mengatur respons peradangan akut (Toma et al., 2021).

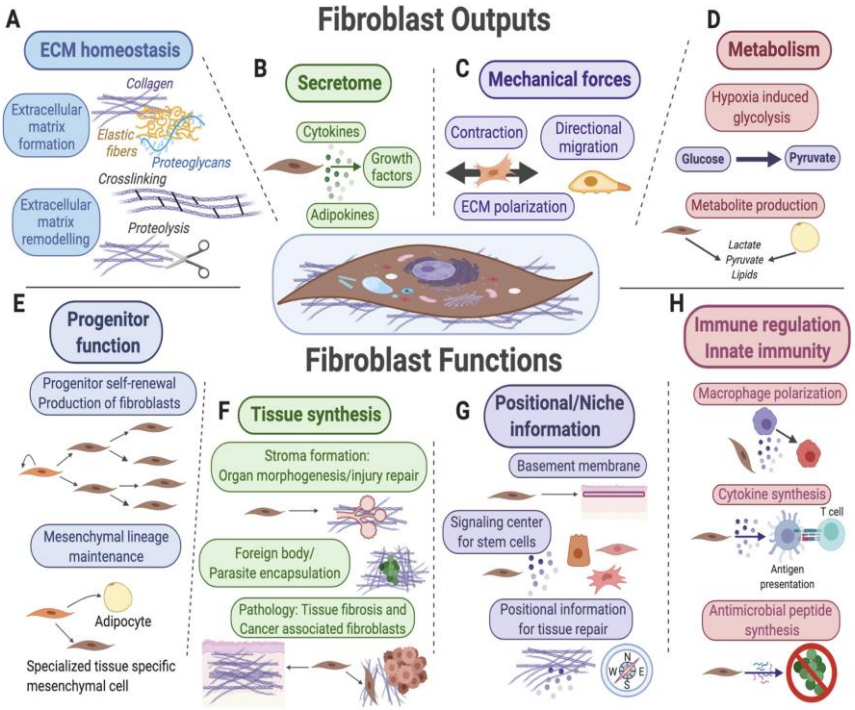
1.5.4. Fibroblas

Fibroblas awalnya diidentifikasi sebagai jenis sel yang berbeda oleh ahli patologi Jerman Rudolf Virchow pada tahun 1858, yang menyebutnya sebagai "*Spindelzelle des Bindegewebes*" atau "sel jaringan ikat berbentuk gelendong". Istilah "fibroblas" pertama kali dicetuskan oleh Ernst Ziegler untuk menggambarkan sel-sel yang memproduksi jaringan ikat baru selama proses penyembuhan. Pengamatan ini juga diperkuat oleh Santiago Ramón y Cajal yang

mengidentifikasi "*célula fusiforme*" atau "fibroblas células" sebagai pembentuk jaringan granulasi yang penting dalam proses penyembuhan luka dan pembentukan bekas luka pada kulit (Pilkus et al., 2021).

Fibroblas merupakan sel yang bertanggung jawab untuk menciptakan dan memelihara struktur jaringan ikat yang kaya akan matriks ekstraseluler (ECM). Matriks ini beragam secara anatomi. Fungsinya untuk mendukung berbagai fungsi organ vital, seperti memberikan ketahanan terhadap luka pada kulit atau memberikan elastisitas pada paru-paru untuk pernapasan yang efisien. Dengan melakukan fungsi ini, fibroblas menjadi kerangka penting serta memberikan informasi lokasi untuk sel-sel di sekitarnya melalui berbagai sinyal yang diterjemahkan dalam bentuk mikroarsitektur, biomekanika, dan biokimia dalam ECM, serta regulasi sekresi mediator terlarut seperti sitokin, *growth factor*, dan metabolit. Selain dari produksi jaringan ikat, fibroblas juga memiliki peran sebagai sel progenitor dari berbagai jenis sel mesenkimal khusus, seperti osteoblas yang membentuk tulang atau adiposit yang mengandung lemak, baik selama perkembangan embrio, tahap homeostasis dewasa, maupun saat terjadi cedera, perbaikan, dan restrukturisasi jaringan. Dalam konteks ini, istilah "fibroblas" merujuk pada sel yang: 1) menghasilkan berbagai makromolekul struktural dan sinyal yang sama yang memengaruhi lingkungan ekstraseluler jaringan, 2) mengadopsi fenotip sementara dan kontraktil sebagai respons terhadap kerusakan jaringan, 3) bertindak sebagai sel yang memberikan sinyal khusus untuk sel punca di dalam jaringan, dan/atau 4) berfungsi sebagai leluhur, terkadang disebut sebagai sel punca mesenkimal, untuk sel-sel mesenkimal yang sudah terdiferensiasi (Moretti et al., 2022).

Peran fibroblas dalam proses penyembuhan luka memiliki sisi yang rumit. Meskipun sel ini sangat penting untuk penyembuhan luka yang sehat, sel ini juga dapat menyebabkan fibrosis dan pembentukan jaringan parut yang berlebihan atau bahkan menghambat kemajuan penyembuhan luka seperti yang terjadi pada luka diabetes dan ulseratif. Fibrosis kulit dapat terjadi sebagai respons terhadap berbagai pemicu, seperti luka bakar termal, trauma mekanis, infeksi, radiasi, pembedahan, atau berkaitan dengan penyakit sistemik seperti skleroderma dan penyakit *graft-versus-host*. Hal ini dapat menghasilkan pembentukan jaringan parut hipertrofik, keloid, dan kontraktur yang dapat mengganggu mobilitas dan re-innervasi kulit. Beberapa populasi fibroblas dermal, sel perivaskular, dan adiposit dermal matang yang terdiferensiasi merupakan sumber myofibroblas teraktivasi dan matriks ekstraseluler fibrotik pada kulit yang terluka atau sakit. Selain itu, peningkatan proliferasi fibroblas dalam lingkungan luka yang memungkinkan dapat dikaitkan dengan peningkatan regenerasi menunjukkan bahwa kelebihan produksi fibroblas bukanlah satu-satunya faktor yang menentukan fibrosis (Cialdai et al., 2022).



Gambar 8. Ringkasan fungsi dan output fibroblas. Peran inti fibroblas (ditampilkan di pusat gambar) dan turunan mesenkimalnya melibatkan sekresi dan remodelling matriks ekstraseluler (ECM) (A), pengeluaran faktor sinyal untuk sel tetangganya (B), penghasilan kekuatan mekanis (C), dan pengaturan metabolisme jaringan serta ekskresi metabolit (D). Fibroblas juga bertindak sebagai sel induk untuk turunan mesenkimalnya (E), berfungsi sebagai "arsitek" pembentukan jaringan baru selama morfogenesis organ, proses penyembuhan jaringan, dan dalam berbagai kondisi patologis (F), memainkan peran penting dalam memberikan informasi posisi di berbagai wilayah anatomi dalam organ yang sama dan sebagai penyedia sinyal utama menuju kompartemen sel induk (G), serta menjadi target dan pengatur reaksi timbal balik dari fungsi imun bawaan dan adaptif yang beragam (H) (Parker et al., 2023)

1.5.5. Tikus Wistar

Pemanfaatan hewan model yang sering disebut sebagai hewan percobaan merupakan langkah penting dalam penelitian in vivo di bidang kesehatan. Hewan model membantu dalam pemahaman fungsi gen, etiologi, dan mekanisme penyakit tertentu, serta dalam pengujian efektivitas dan keamanan obat atau bahan kimia. Salah satu hewan percobaan yang umum digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), yang juga dikenal sebagai Norway Rat dalam penelitian biomedis (Rosidah et al., 2020).

Gambar 9. Tikus wistar (Rattus novergius) (Rosidah et al., 2020)

Tikus Sprague-Dawley merupakan salah satu galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian, karena memiliki perkembangbiakan yang cepat, temperamen yang tenang, dan penanganan yang relatif mudah. Tikus Sprague-Dawley memiliki umur hingga 3,5 tahun, dengan berat badan tikus dewasa biasanya berkisar antara 250-300 gram untuk betina dan 450-520 gram untuk jantan (Rosidah et al., 2020).

Tabel 4. Taksonomi tikus wistar (Rattus norvegicus) (Rosidah et al., 2020)

Klasifikasi Ilmiah	
Kingdom	Animalia (Hewan)
Filum	Chordata
Kelas	Mammalia
Ordo	Rodentia
Subordo	Odontoceti
Famili	Muridae
Genus	*Rattus*
Spesies	*norvegicus*

Penelitian di bidang kedokteran dan biomedis sering memanfaatkan hewan uji seperti mencit dan tikus. Hal ini dikarenakan hewan-hewan tersebut memiliki keunggulan, seperti: sebagai mamalia yang lebih cocok sebagai model biologis, mudah ditemukan, mudah dikembangbiakkan untuk mendapatkan galur murni, mudah dirawat, harganya terjangkau, dapat diaklimatisasi dengan manusia, dan yang terpenting, memungkinkan kita untuk melakukan percobaan dengan berbagai metode yang tidak mungkin dilakukan pada manusia, serta mencit memiliki kemiripan genetik yang dekat dengan manusia (Handajani, 2021).

Sebelum memulai penelitian, peneliti perlu memilih hewan uji yang cocok untuk studi yang akan dilakukan, dengan memperhatikan beberapa faktor berikut (Handajani, 2021):

a. Pemilihan spesies hewan yang relevan dengan tujuan penelitian
b. Persamaan anatomi dan fisiologi dengan manusia
c. Kemudahan dalam perkembangbiakan dan pemeliharaan di lingkungan laboratorium untuk memastikan ketersediaan galur murni dan populasi homogen saat digunakan dalam penelitian
d. Kesesuaian hewan model dengan metode penelitian yang digunakan, serta kemudahan dalam perawatan dan pengadaan

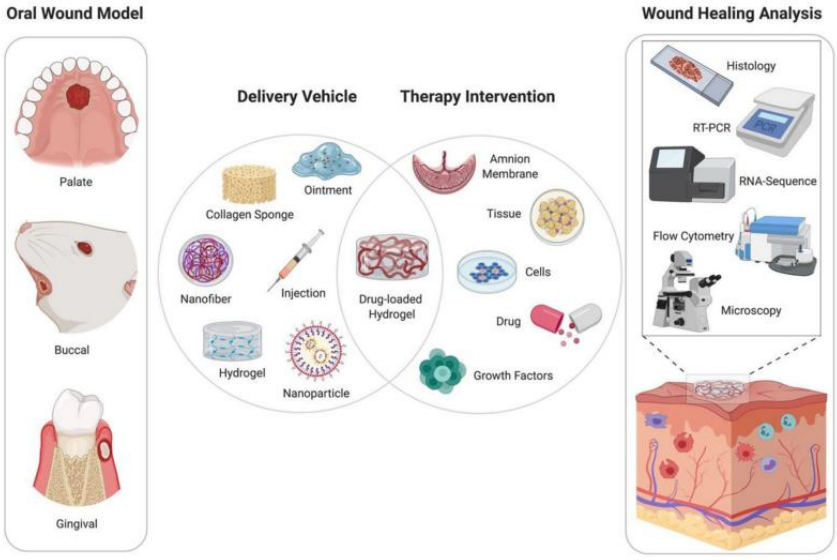
hewan uji yang diperlukan

e. Pertimbangan atas ketersediaan dana yang dimiliki oleh peneliti
f. Ketahanan terhadap penyakit selain yang diinduksi sebagai bagian dari model hewan, untuk meminimalkan risiko infeksi
g. Penggunaan jumlah hewan uji yang minimal namun memberikan kontribusi signifikan terhadap kemajuan pengetahuan dan kesejahteraan manusia.

1.5.5.1. Model luka pada hewan coba

Model luka palatal sering digunakan sebagai model in vivo untuk *orofacial cleft* dan penyembuhan luka pada rongga mulut. Luka pada mulut manusia umumnya bervariasi karena dapat disebabkan oleh trauma, operasi kanker, atau penyembuhan pasca bedah yang tidak optimal, sehingga dimensi luka seperti tinggi, lebar, kedalaman, dan rasio jaringan dapat tidak simetris. Sebagian besar studi mengenai luka palatal menggunakan metode *punch biopsy* untuk menciptakan luka palatal. Pendekatan ini menyediakan konsistensi dan reproduktibilitas dalam berbagai penelitian yang bervariasi tergantung pada organisme, ukuran sampel, dan periode waktu penelitian (Toma et al., 2021).

Model luka bukal umumnya digunakan sebagai model penyembuhan luka yang dapat disebabkan oleh berbagai hal mulai dari luka superfisial saat mengunyah hingga laserasi dalam pasca operasi mulut. Penggunaan model jaringan bukal menggunakan spesies model, waktu ukuran dan jenis luka yang bervariasi. Spesies yang umumnya digunakan adalah tikus, kelinci, atau mencit. Durasi penelitian relatif lebih pendek dibandingkan penelitian model palatal yaitu berkisar antara 5 hingga 28 hari (Toma et al., 2021).



Gambar 10. Skema model dan terapi terkini untuk mendorong penyembuhan luka oral (Toma et al., 2021)

Selain itu, pembuatan model pada jaringan gingiva sangat berbeda dibandingkan dengan jaringan bukal dan palatum lunak. Hal ini dikarenakan gingiva tidak memiliki lapisan submukosa, sehingga lamina basalis langsung terikat ke mukoperiosteum atau periosteum tulang. Jaringan gingiva memiliki waktu penyembuhan yang relatif lebih singkat. Cedera pada gingiva dapat bervariasi mulai dari trauma ringan akibat olahraga hingga operasi yang dilakukan pada perawatan periodontitis. Penelitian ini juga merupakan penelitian yang jangka waktunya paling singkat, berkisar antara 5 hingga 14 hari (Toma et al., 2021).

1.5.5.2. Standar pakan dan pemeliharaan hewan coba

Terdapat banyak fasilitas penangkaran hewan uji yang menyediakan berbagai jenis hewan uji untuk keperluan penelitian. Penting untuk dicatat bahwa untuk mendapatkan hewan uji yang berkualitas, peneliti perlu memperhatikan hal-hal berikut (Handajani, 2021):

a. Pastikan bahwa hewan uji dalam keadaan sehat dan diperoleh dari pemasok yang sah serta memiliki sertifikasi yang tepat.
b. Pengangkutan hewan uji dari pemasok ke laboratorium harus memperhatikan kondisi kesehatan hewan, kondisi cuaca, dan jarak tempuh yang ditempuh.
c. Sebelum memulai penelitian, perlu diperhatikan aspek-aspek seperti kondisi psikologis, waktu, dan pemberian makanan kepada hewan uji untuk memastikan bahwa mereka siap menerima perlakuan yang akan diberikan.

Perawatan atau pemeliharaan hewan uji melibatkan aspek pemberian makanan, air, dan sanitasi. Dalam memberikan makanan dan air kepada hewan uji, perlu memperhatikan hal-hal berikut (Handajani, 2021):

a. Jenis makanan harus sesuai dengan spesies hewan dan kebutuhan nutrisinya, serta bebas dari kontaminasi.
b. Pembelian makanan harus dilakukan dari pemasok yang terpercaya.
c. Makanan dan air harus mudah diakses oleh hewan uji dan disediakan secara *ad libitum*.
d. Proses pengolahan dan penyimpanan makanan harus dilakukan dengan bersih dan tertutup, untuk mencegah masuknya serangga atau hewan pengerat lainnya.
e. Ketersediaan air minum harus selalu diperiksa untuk memastikan tidak ada kebocoran atau blokade yang dapat menghalangi akses hewan uji.
f. Penempatan tempat makan dan minum harus dirancang sedemikian rupa agar mudah dijangkau dan tidak terkontaminasi oleh urine dan feses hewan uji.

Pakan yang tidak sesuai standar memiliki komposisi yang tidak memenuhi kebutuhan hewan sehingga menyebabkan gangguan pada pertumbuhan dan berdampak negatif pada kesehatan dan sistem fisiologis hewan. Dalam penelitian ini, hewan uji diberi makanan standar yang disebut diet tikus laboratorium yang diberikan secara bebas, artinya tidak ada batasan jumlah makanan dan hewan dapat mengakses makanan kapanpun diperlukan. Hal ini dilakukan untuk mencegah stres pada hewan akibat kelaparan. Dengan demikian, dipastikan bahwa hewan yang digunakan dalam penelitian ini mengalami pertumbuhan normal, yang ditunjukkan oleh peningkatan berat badan yang normal (Fitria et al., 2019).

Kebersihan ruangan tempat hewan uji penting untuk mencegah kontaminasi. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam menjaga kebersihan lingkungan kandang hewan uji termasuk (Handajani, 2021):

a. Ruangan, kandang, dan koridor di kandang hewan uji harus tetap bersih dan dilengkapi dengan sistem aliran untuk proses pembersihan.
b. Keadaan ruangan hewan harus disesuaikan dengan habitat alami hewan tersebut dan diupayakan untuk tetap kering, kecuali untuk hewan yang memerlukan lingkungan dengan kelembaban tertentu.
c. Kandang, tempat makan, dan tempat minum harus rutin dibersihkan untuk memastikan kebersihan dan mencegah kontaminasi.
d. Penggunaan bahan kimia sebagai penghilang bau sebaiknya diminimalkan atau dihindari sebisa mungkin.

1.6. Hipotesis

Terdapat pengaruh aplikasi ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) terhadap penyembuhan dan peningkatan jumlah fibroblas pada luka mukosa oral tikus.

BAB II
METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Dipilih karena baik pada sampel maupun perlakuan dapat terkendali, terukur lebih dapat dipercaya. Adapun rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan dengan *the post only control group design*, yaitu kelompok yang diberi perlakuan dan kelompok *control* kemudian dilakukan observasi.

2.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

2.2.1. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan ekstrak jintan hitam dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.
2. Pemeliharaan hewan coba dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.
3. Pemeriksaan histologi jumlah fibroblas dilakukan Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit UNHAS, Universitas Hasanuddin.

2.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2024 – Juli 2024

2.3. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

2.3.1. Variabel Penelitian

1. Variabel dependen: Jumlah fibroblas
2. Variabel independen: Ekstrak jintan hitam
3. Variabel terkontrol: Tikus wistar

2.3.2. Definisi Operasional Penelitian

1. Ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) merupakan kandungan senyawa aktif dari biji jintan hitam yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etil asetat.
2. Hewan coba adalah tikus wistar jantan yang berumur sekitar 6-8 minggu yang diadaptasi dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari. Eksperimen dilakukan sesuai dengan kode etik untuk perlakuan terhadap hewan coba.
3. Fibroblas merupakan sel yang bertanggung jawab untuk menciptakan dan memelihara struktur jaringan ikat yang kaya akan matriks ekstraseluler (ECM). Sel ini berperan penting dalam fase *remodelling* penyembuhan luka. Peningkatan jumlah fibroblas menandakan peningkatan kualitas penyembuhan luka.

2.4. Teknik dan Besar Sampel Penelitian

2.4.1. Teknik Sampling

Jumlah sampel dalam penelitian dibagi menjadi 8 kelompok dan dapat dihitung dengan menggunakan rumus Indra (1999).

Rumus Indra : n = (15+p)/p

n = (15+8)/8

n = 23/8

n = 2,875

n ≈ 3

Keterangan :

n = besar sampel tiap kelompok.

p = banyaknya kelompok jumlah intervensi atau pengamatan.

Berdasarkan perhitungan diatas didapatkan minimal jumlah 3 tikus wistar untuk 8 macam kelompok perlakuan, sehingga didapatkan jumlah keseluruhan hewan coba dalam penelitian ini adalah 24 ekor.

2.4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan yaitu hewan uji tikus putih (Rattus novergicus) sebanyak 24 ekor tikus wistar dengan bahan uji yaitu ekstrak jintan hitam (Nigella sativa) dengan tujuan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap penyembuhan luka, dengan kriteria :

1. Kriteria Inklusi
    a. Tidak memiliki cacat fisik
    b. Jenis kelamin jantan
    c. Berat badan 150-250 gram
    d. Umur sekitar 6-8 minggu
2. Kriteria Ekslusi
    a. Tikus tidak dalam keadaan sehat
    b. Tikus memiliki penyakit sistemik
    c. Aktivitas dan tingkah laku tikus tidak normal
    d. Tikus mati saat penelitian

2.5. Prosedur Penelitian

2.5.1. Pengurusan Etik Penelitian

Setelah melakukan seminar proposal penelitian dan mendapatkan persetujuan terhadap penelitian yang akan dilakukan, peneliti segera mengurus berkas-berkas untuk mendapatkan Surat Etik Penelitian sehingga penelitian dapat segera dilakukan. Berkas-berkas tersebut kemudian akan dievaluasi oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin yang berlokasi di Rumah Sakit Gigi dan Mulut, Universitas Hasanuddin.

2.5.2. Persiapan Alat dan Bahan

1. Alat
   a. Mikroskop listrik
   b. *Punch biopsy 2 mm*
   c. Swab steril
   d. Wadah spesimen pot plastic
   e. Cotton bud
   f. Rotary evaporator
   g. Mikrotom
   h. Glass slide
   i. Oven
   j. Penggiling elektrik
   k. Lemari es
   l. Botol vial
   m. Handle
2. Bahan
   a. Jintan hitam
   b. Tikus wistar jantan
   c. Pakan standar
   d. Aquades
   e. Etil asetat
   f. *Haematoxylin-Eosin (*HE)
   g. *Povidone Iodine*
   h. Alkohol 70%, 80% dan absolut
   i. Kertas saring (whitmann no.42)
   j. Gliserin
   k. CMC
   l. Blotting paper
   m. Ketamin
   n. Xylol
   o. Blok paraffin
   p. *Blade*

2.5.3. Pengolahan Ekstrak

Biji *Nigella sativa L*. dibersihkan, dicuci dan dikeringkan dengan ditiriskan di *blotting paper* selama 2 hari di suhu ruangan. Biji yang telah dikeringkan digiling hingga menjadi bubuk halus menggunakan penggiling listrik. Sampel dimaserasi dengan etil asetat dengan menggunakan alat *Orbital Rotary Shaker* pada suhu 32ºC dengan kecepatan 200rpm hingga mengental. Sampel kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 2000 rpm pada suhu kamar. Setelah itu, sampel disaring dengan kertas saring (Whatmann No. 42). Ekstrak diuapkan hingga kering dalam ruang hampa menggunakan uap Rota pada suhu 40ºC pada tekanan konstan hingga pelarut menguap dan terbentuk ekstrak kental. Ekstrak kental dimasukkan dalam botol vial gelap dan ditimbang total

ekstraknya. Ekstrak kemudian diformulasikan dengan CMC agar menjadi bentuk gel dan dapat diberikan pada hewan coba melalui topikal.

2.5.4. Pembagian Kelompok pada Hewan Coba

Menurut rumus Inda (1999), 8 kelompok perlakuan membutuhkan total 24 tikus dengan jumlah masing-masing tikus per-kelompok adalah sebanyak 3 ekor. Setelah seluruh bahan siap, hewan coba diberikan waktu untuk beradaptasi terlebih dahulu dengan lingkungan laboratorium dan pakan standar. Pada waktu ini, tikus juga dipersiapkan agar memiliki berat yang sesuai dengan kriteria inklusi. Waktu adaptasi yang diperlukan biasanya mencapai 1 minggu. Setelah itu, dilakukan randomisasi pengelompokan tikus ke dalam 8 kelompok perlakuan, yakni kelompok K1 (kontrol negatif aquades 7 hari), K2 (kontrol positif povidone iodine 7 hari), K3 (ekstrak jintan hitam 5% 7 hari), K4 (ekstrak jintan hitam 10% 7 hari), K5 (kontrol negatif aquades 14 hari) , K6 (kontrol positif povidone iodine 14 hari), K7 (ekstrak jintan hitam 5% 14 hari), dan K8 (ekstrak jintan hitam 10% 14 hari).

2.5.5. Perlakuan pada Hewan Coba

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus dianastesi dengan menggunakan ketamin secara intramuskuler. Tikus diberi perlukaan pada gingiva labial gigi incisivus sentralis mandibula dengan menggunakan *punch biopsy* 2 mm. Perlakuan pada tikus dibagi menjadi 2 tahap. Tahap pertama adalah perlakuan terhadap seluruh kelompok yang akan diakhiri dengan euthanasia pada hari ke-8. Sedangkan tahap kedua adalah perlakuan lanjutan dari kelompok yang tersisa yang akan diakhiri dengan euthanasia pada hari ke-15. Dua kelompok kontrol negatif (K1 dan K5) dioleskan aquades steril sebanyak 0.2 ml, dua kelompok kontrol positif (K2 dan K6) dioleskan povidone iodine 0.2 ml. Dua kelompok perlakuan K3 dan K7 dioleskan ekstrak jintan hitam 5% 0.2 ml, serta K4 dan K8 dioleskan ekstrak jintan hitam 10% 0.2 ml. Penggunaan persentase ekstrak 5% dan 10% dirujuk dari penelitian sebelumnya yang menunjukan efikasi ekstrak jintan hitam 10% dibandingkan 5% sebagai obat herbal. Setiap kelompok diberikan bahan 2 kali dalam sehari selama 7 hari. Kelompok tikus K1, K2, K3 dan K4 dilakukan euthanasia pada hari ke-8 sebelum dibuatkan preparat dengan cara memberikan *over dosis* ketamin. Euthanasia dilakukan pada hari ke-8 didasarkan pada fase proliferasi penyembuhan luka. Dalam seminggu, fase proliferasi meningkatkan migrasi fibroblas, meningkatkan jaringan pembuluh darah melalui angiogenesis, dan meningkatkan migrasi makrofag. Kemudian, perlakuan dilanjutkan pada kelompok tikus K5, K6, K7 dan K8 hingga hari ke-14. Euthanasia untuk kelompok-kelompok tersebut dilakukan pada hari ke-15. Euthanasia dilakukan pada hari ke-15 didasarkan pada fase remodeling penyembuhan luka.

2.5.6. Pembuatan sampel untuk preparat pemeriksaan histologi

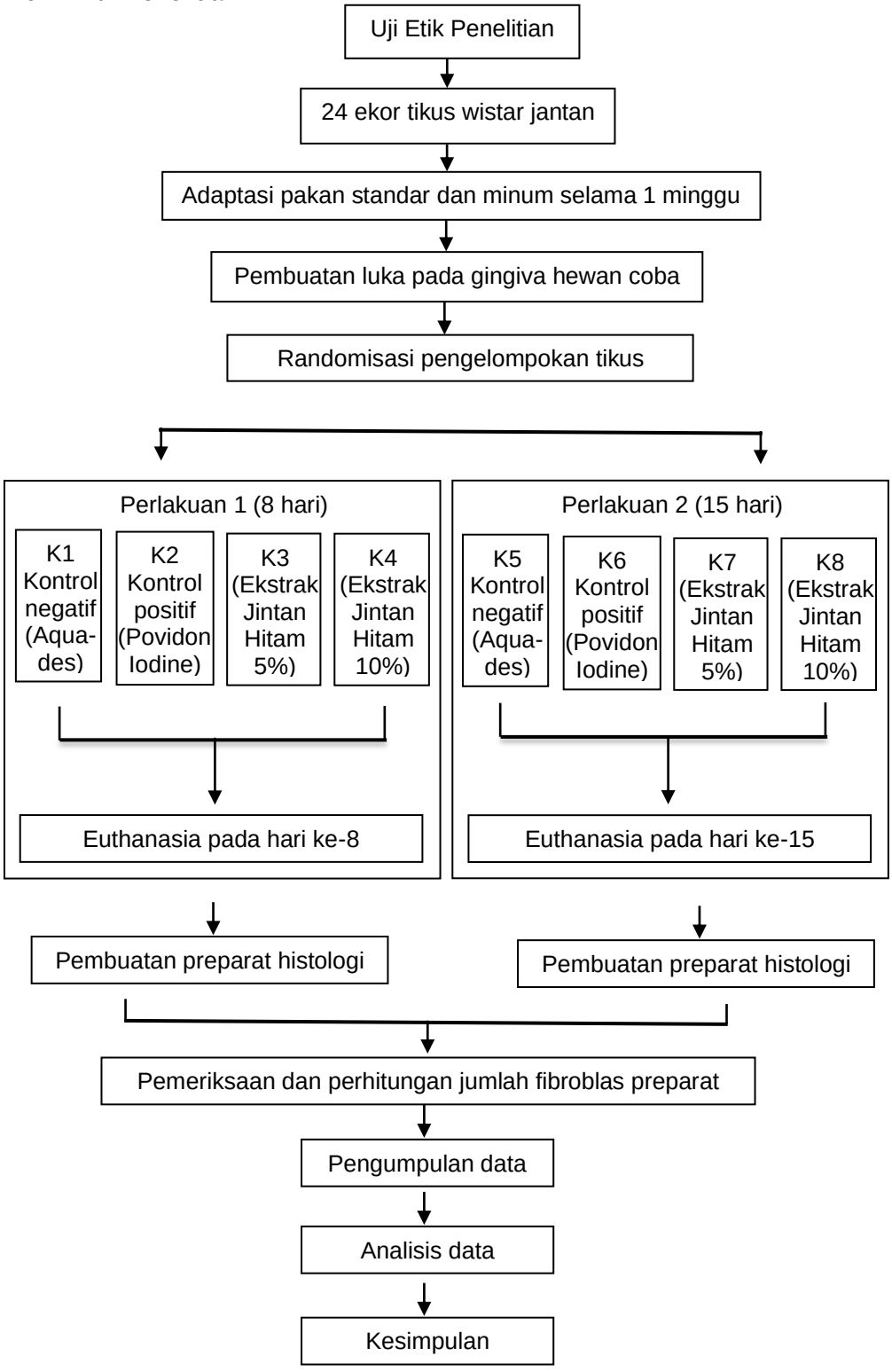
Jaringan dipotong dan dimasukkan ke dalam wadah spesimen pot plastik yang disebut kaset kemudian didehidrasi dengan merendamnya ke dalam alkohol 70%, 80% dan 90%, dan alkohol absolut. Pemurnian dan infiltrasi dilakukan

dengan xylol. Setelah dicetak dalam blok parafin dan disimpan di lemari es, blok parafin dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan irisan 5-6 µm, diapungkan dalam air dengan suhu 60ºC untuk menghindari lipatan sediaan kemudian diangkat dan diletakkan di atas kaca objek untuk melakukan pewarnaan hematoxylin dan eosin (HE).

2.5.7. Penghitungan Sel Fibroblas

Pemeriksaan histologi sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Universitas Hasanudin. Sel fibroblas pada sediaan preparat jaringan dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan perbesaran 400x untuk fibroblas. Rerata jumlah fibroblas dihitung pada 5 lapang pandang. Jumlah fibroblas dihitung secara sistematis mulai dari pojok kiri bawah kemudian digeser kekanan dan ditarik keatas demikian seterusnya sehingga semua lapang pandang terbaca. Pemeriksaan HE dilakukan untuk melihat peningkatan jumlah fibroblas. Fibroblas akan berwarna pucat dan kolagen akan berwarna merah muda pada mikroskop.

2.5.8. Analisis Data

Analisis data digunakan untuk membandingkan jumlah sel fibroblas antara berbagai kelompok perlakuan, menggunakan metode statistik *One-way ANOVA*. Sebelum melakukan uji *One Way ANOVA*, dilakukan uji normalitas menggunakan tes *Shapiro-Wilk*. Jika syarat ANOVA tidak terpenuhi, maka akan dilakukan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Uji statistik kemudian dilanjutkan dengan tes *Post-Hoc LSD (Least Significance Difference*) jika terdapat hasil yang signifikan secara statistik.

2.6. Alur Penelitian