

# LAPORAN PENELITIAN TAHUN II

Hibah  
PENELITIAN KERJASAMA ANTAR PERGURUAN TINGGI  
(HIBAH PEKERTI)

**EFEK KEMOPREVENTIF EKSTRAK ETANOLIK  
BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa*) PADA KANKER PAYUDARA  
TIKUS TERINDUKSI DMBA MELALUI DETEKSI GEN P53 DAN RAS  
SERTA AKTIFITAS ENZIM *GLUTATHION-S-TRANSFERASE***

Tim Peneliti Pengusul :  
Sri Tasminatun, S.Si.,M.Si., Apt (Ketua)  
Sri Nabawiyati Nurul Makiyah,S.Si.,M.Kes (Anggota)

Tim Peneliti Mitra :  
Drs. Edy Meiyanto, M.Si., Ph.D., Apt (Ketua)  
Prof. Dr. Suwidjiyo Pramono, DEA.,Apt (Anggota)

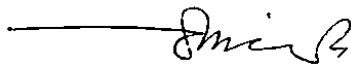
**UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA  
NOVEMBER 2007**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul	: Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik Biji Jinten Hitam ( <i>Nigella sativa</i> ) pada Kanker Payudara Tikus terinduksi DMBA Melalui Deteksi gen <i>p53</i> dan <i>ras</i> serta aktivitas enzim glutation s-transferase
Lingkup Penelitian	: Onkologi Molekuler
Tim Peneliti Pengusul	
a. Ketua	: Sri Tasminatun, S.Si., M.Si., Apt
Jenis Kelamin	: Perempuan
Pangkat/Jabatan	: III A / Asisten Ahli Madya
NIK	: 173.036
Prodi/Fak/Lemlit	: KU/Kedokteran/UMY
b. Anggota	: Sri Nabawiyati Nurul Makiyah, S.Si., M.Kes
Prodi/Fak/Lemlit	: KU/Kedokteran/UMY
Tim Peneliti Mitra	
a. Ketua	: Drs. Edy Meiyanto, M.Si., Ph.D., Apt
Jenis Kelamin	: Laki-laki
Pangkat/Jabatan	: IIID/Lektor
NIK	: 131 857 330
Prodi/Fak/Lemlit	: Biokimia & Biologi Molekuler / Fakultas Farmasi/UGM
b. Anggota	: Prof. Dr. Suwidjiyo Pramono, DEA., Apt
Prodi/Fak/Lemlit	: Biologi Farmasi / Fakultas Farmasi / UGM
Perguruan Tinggi Pengusul	: Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
Perguruan Tinggi Mitra	: Universitas Gadjah Mada
Jangka waktu penelitian	: 1 tahun
Lokasi Penelitian	
a. TPP	: Lab Farmakologi Fakultas Kedokteran UMY Lab Histologi Fakultas Kedokteran UMY
b. TPM	: Lab Biologi Molekuler Fakultas Farmasi UGM Lab Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM
Dana yang Disetujui Tahun II	: Rp 64.000.000,- (Enampuluh empat juta rupiah)

Yogyakarta, 30 November 2007  
Ketua TPP

Ketua TPM



Drs. Edy Meiyanto, M.Si., Ph.D., Apt  
NIP 131 857 330



Sri Tasminatun, S.Si., M.Si., Apt  
NIK : 173 036



Ketua Lembaga Penelitian UMY



Mengetahui,



Dekan Fakultas Kedokteran UMY



## PRAKATA

Segala Puji bagi Allah SWT yang telah memberikan keselamatan, rahmat dan barokah sehingga laporan penelitian Hibah PEKERTI tahun II dengan judul "Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*) pada Kanker Payudara Tikus terinduksi DMBA Melalui Deteksi gen *p53* dan *ras* serta aktivitas enzim glutathion s-transferase" dapat diselesaikan. Penelitian ini merupakan penelitian kerja sama antara Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang didanai oleh DP2M Ditjen Dikti melalui program HIBAH PEKERTI tahun 2007-2008.

Dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan laporan ini, penulis banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itu penulis dengan tulus hati menyampaikan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Dekan Fakultas Kedokteran UMY
2. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana melalui Program Penelitian HIBAH PEKERTI tahun 2007
3. Drs. Edy Meiyanto, M.Si., Ph.D., Apt selaku ketua peneliti mitra yang telah membimbing dengan penuh kesabaran hingga penelitian dan penulisan laporan ini selesai
4. Prof. Dr. Suwidjiyo Pramono, DEA., Apt, selaku peneliti mitra yang telah membimbing dan memberikan banyak saran selama penelitian
5. Staff dan karyawan Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UMY atas fasilitas dan bantuan selama penelitian
6. Staff dan karyawan Laboratorium Biologi Farmasi dan Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi UGM atas fasilitas dan bantuan selama penelitian
7. Staf dan karyawan Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Farmasi UGM, atas fasilitas dan bantuan selama penelitian
8. Seluruh anggota CCRC Fakultas Farmasi UGM

Semua pihak yang tak dapat disebut satu persatu yang telah memberi bantuan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan dan menjadi amal sholeh Bapak, Ibu dan saudara sekalian. Amien.

Akhir kata penulis hanya berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya. Penulis menyadari segala kelemahan dan kekurangan penelitian ini, kritik dan saran selalu diharapkan

## DAFTAR ISI

ISI	HALAMAN
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
A. Kanker .....	3
B. Kanker Payudara .....	6
C. Karsinogenesis .....	9
D. <i>Nigella sativa</i> .....	11
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN I .....	16
BAB IV. METODE PENELITIAN	17
A. Pembuatan ekstrak Etanolik Biji Jinten Hitam ( <i>Nigella sativa</i> )	17
B. Uji efek ekstrak etanolik <i>N sativa</i> pada aktifitas Glutathion s transferase .....	17
C. Uji efek ekstrak etanolik <i>N sativa</i> pada mutasi gen <i>p53</i> dan <i>ras</i>	20
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
BAB V. KESIMPULAN .....	33
DAFTAR PUSTAKA 1 .....	34
LAMPIRAN	37

## BAB I

### PENDAHULUAN

Insidensi kanker payudara pada wanita Indonesia menempati urutan kedua setelah kanker leher rahim (Tjindarbumi *and* Mangunkusumo, 2002). Usaha penyembuhan sangat sulit karena kanker merupakan penyakit seluler dengan patofisiologi yang kompleks dan melibatkan proses mikroevolusioner. (King, 2000). Pemberian kemoterapi antikanker memiliki efek farmakologi yang kurang selektif, efek samping yang merugikan dan dilaporkan adanya resistensi beberapa jenis kanker.

Indonesia merupakan mega senter keanekaragaman hayati terbesar di dunia, berupa tumbuhan tropis dan biota laut. Salah satu jenis tumbuhan yang secara empiris telah digunakan dalam pengobatan adalah jinten hitam (*Nigella sativa*). Aktivitas anti kanker *N sativa* diteliti secara *in vitro* pada *cancer cell lines Ehrlich ascites carcinoma* (EAC), *Dalton's lymphoma ascites* dan sel *sarcoma-180*. Thymoquinine dalam *N. sativa* menghambat *fibrosarcoma* mencit terinduksi 20-methylcholanthrene (Randhawa *et al.*, 2002). Penelitian El-Kadi dan Kandil (1986) membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji *N sativa* dapat meningkatkan aktivitas *natural killer cells* 200-300%. Efek lain yang dimiliki *Nigella sativa* adalah efek antioksidan (Burits *and* Bucar, 2000), stimulasi sistem imun (Joones, 2000) antiinflamasi dan analgetik (Al Ghamdi *et al.*, 2001). Menurut Surh (2002) senyawa yang mempunyai efek antiinflamasi dapat

Penelitian Tasminatun *et al.*, (2005) menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji *N. sativa* mempunyai efek kemopreventif pada terjadinya kanker kulit mencit yang diinduksi oleh sinar ultraviolet yang ditandai dengan menurunnya insidensi kanker kulit, penurunan *tumour multiplicity*, gambaran histologi kulit yang lebih baik serta peningkatan ekspresi p53.

Data ilmiah tentang efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *N sativa* pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA belum ditemukan. Untuk memperoleh informasi ilmiah ini, perlu dilakukan penelitian tentang efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *N sativa* pada kanker payudara tikus terinduksi 7,12-Dimetilbenz (a) antrasen (DMBA) melalui deteksi gen *p53* dan *ras* serta aktivitas enzim glutathion s-transferase.

Tujuan umum penelitian adalah mengetahui efek kemopreventif ekstrak etanolik *N. sativa* pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA melalui mekanisme pengamatan molekuler farmakodinamik. Tujuan khusus penelitian tahun ke-2 adalah (1) mengetahui aktifitas enzim Glutathion-s-transferase yang dimobilisasi metabolit DMBA (2) menganalisis mutasi gen *p53* dan *ras* pada proses mutagenesis. Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu : (i) Ekstraksi biji *N. sativa* (ii) Uji aktifitas enzim Glutathion-s-transferase (iii)

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Kanker

Kanker merupakan penyakit seluler dengan ciri adanya sifat pertumbuhan yang tidak terkendali. Sel normal dapat mengendalikan pertumbuhan dan diferensiasi untuk menjaga homeostasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Setiap sel yang menyusun tubuh dapat menjadi kanker sehingga dapat mengakibatkan terganggunya keseimbangan fungsi tubuh secara keseluruhan. Perubahan sifat pertumbuhan tersebut disebabkan karena adanya perubahan genetik (transformasi), utamanya pada gen-gen yang mengatur pertumbuhan, yaitu onkogen dan gen tumor suppressor (Meiyanto, 1999).

Terjadinya kanker meliputi banyak tahapan, dimana pada setiap tahapan menggambarkan perubahan genetik yang akan mendorong transformasi sel normal menjadi sel kanker / *malignant* (Hanahan and Weinberg, 2000).

Sel kanker mempunyai ciri-ciri yang khas pada fenotipnya, yang berbeda dengan sel normal, karena adanya mutasi pada genotipnya. Secara umum ciri-ciri dari sel kanker adalah :

1. Memiliki kemampuan mencukupi *signal* pertumbuhan sendiri

Sel normal harus menerima *signal* pertumbuhan mitogenik terlebih dahulu sebelum berubah dari fase istirahat menuju fase proliferasi yang aktif, sedangkan sel kanker mampu menghasilkan beberapa *signal* pertumbuhan sendiri sehingga mengurangi ketergantungan pada *signal* dari lingkungan sekitarnya. Kemampuan

transduksi atau pada proses penerjemahan *signal* menjadi aksi dari sirkuit intraselular. Sel kanker memiliki kemampuan untuk mensintesis faktor pertumbuhan dan mempunyai kemampuan pada pembalikan *signal* (*positive feed back signaling*) yang dinamakan *autocrine*. Liberasi dari ketergantungan *signal* secara eksogen ini merusak mekanisme homeostatis penting yang secara normal berfungsi menjamin keberaturan dari bermacam-macam sel dalam jaringan (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 2. Tidak sensitif terhadap *signal* antiproliferatif

*Signal* antiproliferatif bekerja untuk menjaga keteraturan sel dan homeostatis jaringan pada sel normal. *Signal* antiproliferatif dapat memblokir proliferasi dengan dua mekanisme berbeda yaitu sel dipaksa keluar dari fase proliferasi yang aktif menuju fase istirahat ( $G_0$ ) atau sel diinduksi untuk melepaskan potensi proliferasi secara permanen dengan menginduksi sel masuk ke dalam fase postmitotik. Sel kanker mampu menghindar dari *signal* antiproliferatif yang berhubungan dengan daur sel, secara spesifik dengan kemampuannya mengatur fase  $G_1$ . Mekanismenya antara lain melarutkan *signal* molekul TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ). TGF- $\beta$  menyebabkan sintesis protein p15 dan p21, yang dapat memblokir kompleks Cyc-Cdk sehingga tidak dapat memfosforilasi pRb (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 3. Kemampuan menghindari apoptosis

Apoptosis memiliki peranan yang amat penting untuk menjaga homeostatis perkembangbiakan sel. Peran penting apoptosis adalah untuk



menyebabkan kanker (Meiyanto, 1999). Bila program apoptosis telah selesai pada sel maka akan meninggalkan kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis yang akan segera dikenali oleh makrofag dan dimakan (*engulfed*) (Peter *et al.*, 1997 *cit* Meiyanto, 1999). Salah satu mekanisme apoptosis dimulai dari ditemukan kerusakan DNA, maka p53 tumor suppressor protein, akan mengupregulasi ekspresi dari protein proapoptosis (Bax, KILLER/DR5, NOXA) yang akan memerintahkan mitokondria untuk mengeluarkan sitokrom C, yang akan mengkatalisis terjadinya apoptosis (Nakamura, 2003). Pada kanker, mekanisme apoptosis ini hilang. karena mutasi pada gen *p53* (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### 4. Kemampuan replikasi yang tak terbatas

Tiga kemampuan sel di atas menyebabkan hilangnya hubungan dengan *signal* pertumbuhan sel dalam lingkungan, sehingga sel kanker mampu tumbuh terus menerus tidak terbatas (Hanahan and Weinberg, 2000). Pertumbuhan tidak terbatas ini disebabkan oleh karena sel-sel kanker mampu mengatasi krisis batas maksimum pertumbuhan. Batas maksimal pertumbuhan ini umum terjadi pada sel normal yang disebabkan oleh pemendekan telomere (*telomer erosion*) hingga batas kritis. Ini dinamakan *senescence* yang selanjutnya sel akan mengalami kematian (*mortal*). Sel kanker mempunyai kemampuan untuk mengatasi keadaan krisis ini sehingga sel menjadi *immortal*. Mekanismenya melalui upregulasi kemampuan untuk mempertahankan panjang telomere (Hanahan

#### 5. Kemampuan membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis)

Untuk berkembang menjadi massa yang besar sel membutuhkan nutrisi dan oksigen. Nutrisi dan oksigen ini dipasok melalui pembuluh darah. Sel kanker memiliki kemampuan angiogenesis (Folkman, 1997) yaitu proses pembentukan pembuluh darah baru. *Signal* inisiasi pada proses angiogenesis ini diantaranya adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### 6. Invasif dan metastasis

Selama masa perkembangannya, kebanyakan sel kanker mampu menghasilkan dan melepas sel pioner yang dapat berpindah, menginvasi jaringan didekatnya, kemudian pindah ke tempat lain, membentuk koloni dan tumbuh di tempat itu. Proses ini dinamakan metastasis. Metastasis merupakan penyebab 90% kematian penderita kanker. Beberapa protein terlibat yang pada proses perlekatan sel dalam jaringan adalah *cell adhesion molekules* (CAM). Diantaranya E-cadherin dan integrin yang menghubungkan sel dengan matrix ekstraseluler. Pada kanker kebanyakan CAM telah hilang, sehingga terjadi proses invasi dan metastasis (Hanahan and Weinberg, 2000).

### **B. Kanker Payudara**

Insidensi karsinoma payudara dikebanyakan negara meningkat 1 – 2 % tiap tahun, sehingga mulai tahun 2000 kira-kira 1 juta wanita tiap tahun menderita

menempati urutan kedua setelah kanker leher rahim (Tjindarbumi and Mangunkusumo, 2002).

Kelenjar payudara merupakan kelenjar kulit khusus yang terletak di dalam jaringan bawah kulit (subkutan) dan ditemukan pada pria maupun wanita. Pertumbuhannya kelenjar ini lambat selama masa prepubertas. Saat pubertas, terutama pada wanita, kelenjar ini tumbuh pesat yang dasarnya adalah penambahan jaringan lemak, lobus dan lobulus. Lobulus terutama terdiri atas duktus yang merupakan unsur jaringan epitel utama. Duktus dibatasi oleh epitel selapis atau dua lapis kuboid mulai dari saluran yang kecil sampai saluran utama. Kelenjar ini tetap tidak sempurna tumbuhnya pada wanita sampai terjadi kehamilan (Leeson *et al.*, 1989).

Dari hasil-hasil studi epidemiologi, baik yang dilakukan secara observasional maupun eksperimental, telah banyak didapatkan faktor-faktor yang berhubungan dengan terjadinya kanker payudara tetapi sampai sekarang belum diketahui penyebab pasti dari kanker payudara. Faktor-faktor ini dikenal sebagai faktor resiko kanker payudara, antara lain adalah wanita umur lebih dari 40 tahun yang tidak mempunyai anak, wanita yang mempunyai anak pertama pada umur lebih dari 40 tahun, wanita yang tidak kawin, menarche lebih dini (12 tahun), menopause yang lambat, riwayat trauma pada payudara, konsumsi tinggi makanan berlemak, masa menyusui yang singkat (Rasmiati, 1999).

Estrogen ikut mengatur pertumbuhan dan diferensiasi epitelium payudara normal. Pada insidensi kanker payudara, estrogen berpengaruh pada pertumbuhan

menginduksi enzim dan protein dalam sintesa asam nukleat dan mengaktifkan onkogen. Sedangkan efek tidak langsung melalui stimulasi prolaktin dan menghasilkan *growth factor* dan *non growth factor protein* (seperti activator plasminogen) (Clemons and Goss, 2001).

Mekanisme molekuler yang mengawali kanker payudara masih sedikit diketahui, tetapi telah ada penelitian yang menerangkan bahwa ekspresi onkogen seperti *myc*, *ErbB-2* atau salah satu famili *Ras* banyak ditemukan di lebih dari 60% kasus kanker payudara. Perubahan gen *myc* melalui amplifikasi (terjadi sekitar 18 % dari kasus kanker payudara), terutama tergambar pada *infiltrating ductal carcinoma* dan berhubungan dengan *inflammatory carcinoma*. Peningkatan kadar Hras terjadi pada kanker payudara primer. Ekspresi *Ras p21* meningkat pada kanker payudara yang ganas (63 - 83%). Sekitar 23 % kasus kanker payudara menunjukkan peningkatan ekspresi onkogen *ErbB-2* dan *ErbB-1*. Hilangnya fungsi gen tumor suppresor *p53* juga berhubungan dengan terjadinya kanker payudara (Macdonald and Ford, 1997).

*Breast Cancer Antigen-1 (BRCA<sub>1</sub>)* pada kromosom 17 dan dan *Breast Cancer Antigen-2 (BRCA<sub>2</sub>)* pada kromosom 13 merupakan gen yang menimbulkan predisposisi untuk kanker payudara. Terutama keluarga yang mempunyai gen *BRCA<sub>1</sub>* dapat dijumpai juga resiko yang meningkat untuk karsinoma ovarium. Menurut perkiraan mutasi gen *BRCA<sub>1</sub>* terdapat pada 10.000

### C. Karsinogenesis

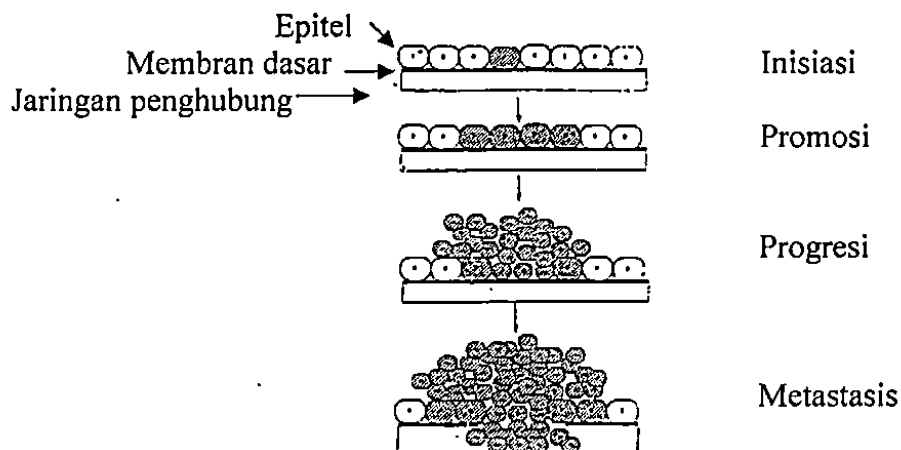
Pertumbuhan kanker merupakan proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung beberapa bulan atau beberapa tahun (King, 2000). Proses pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis, yaitu dimulai dari satu sel kanker yang memperbanyak diri dan membentuk satu koloni kecil dalam jaringan yang sama. Perkembangan berikutnya akan terjadi perubahan genetik (seperti aktivasi onkogen) yang disebabkan koloni dari sel abnormal ini menjadi maligna.

Beberapa penelitian membuktikan bahwa tumorigenesis pada manusia adalah suatu proses multistap dari perubahan-perubahan genetik. Pada gen sel-sel tumor terjadi perubahan di berbagai bagian, baik berupa kekacauan sehalus mutasi titik maupun yang nyata seperti perubahan pada komplemen kromosomnya (Hanahan and Weinberg, 2000).

Sel-sel normal patuh pada signal-signal inhibitor internal dan eksternal, yang mana pada saat karsinogenesis, hilang atau berkurang dengan tingkatan yang berbeda-beda. Oleh sebab itu, identifikasi terhadap signal-signal pengaturan ini menjadi penting untuk mempelajari bagaimana lingkungan ekstraseluler dapat mempengaruhi fungsi sel, bagaimana suatu sel kanker mampu memanipulasi lingkungannya dan apa yang menentukan perilaku keseluruhan dari masa sel kanker (King, 2000).

Proses karsinogenesis melalui beberapa fase, yang meliputi fase inisiasi, fase promosi, fase progresi, dan metastasis. Inisiasi merupakan fase pertama dan merupakan hasil dari adanya perubahan genetik yang menyebabkan terjadinya

tahap ini sel mendapatkan pacuan dari tumor promoting faktor yang menyebabkan pertumbuhan yang cepat dan pembentukan tumor benigna. Pada fase progresi, perubahan genetik semakin bertambah banyak sehingga akan menambah koloni sel tumor. Tumor pada stadium ini bersifat invasif dan seringkali diikuti dengan proses pembentukan pembuluh darah baru yang dinamakan angiogenesis. Fase berikutnya adalah metastasis, yaitu perkembangan tumor yang bersifat malignan dan terjadinya pelepasan sel-sel tumor ganas dari koloni primernya. Sel-sel tumor ganas ini dapat memasuki saluran pembuluh darah sehingga dapat menyebar ke seluruh tubuh dan berkembang di tempat yang jauh (Schneider, 1997).



**Gambar 1. Tahapan-tahapan dalam proses karsinogenesis (Schneider, 1997)**

Invasi dan metastasis merupakan suatu peristiwa yang tergantung pada angiogenesis. Berdasarkan sebuah pandangan praktis dari penemuan dan terapi obat, kebanyakan inhibitor angiogenesis juga mempunyai aksi sebagai antiinvasi

... (Dunn, 1999)

#### D. Jinten Hitam (*Nigella sativa*)

Jinten hitam tumbuh liar di daerah-daerah pegunungan dan tempat lain sampai ketinggian 1100 m dari permukaan laut sebagai gulma semusim (Mardisiswoyo dan Rajakmangunsudarso, 1985; Anonim, 1985). Ada juga yang ditanam orang di halaman dan di ladang sebagai tanaman rempah-rempah. Tanaman ini dibudidayakan dengan biji (Anonim, 1985).

Morfologi dari tumbuhan berupa semak dengan daun tunggal, lonjong, ujung dan pangkal runcing, tepi berongga, pertulangan menyirip, hijau (Hutapea, 1994), kasar dan berbau agak langu (Mardisiswoyo dan Rajakmangunsudarso, 1985). Batang biasanya berusuk dan berbulu kasar rapat/ jarang-jarang dan disertai dengan adanya bulu-bulu yang berkelenjar. Kelopak bunga 5, bundar telur, ujungnya agak meruncing sampai agak tumpul, pangkal mengecil membentuk sudut yang pendek dan besar. Mahkota bunga pada umumnya 8, agak memanjang, lebih kecil dari kelopak bunga, berbulu jarang dan pendek., lanset, ujung memanjang berbentuk benang, ujung bibir bunga bagian bawah tumpul (Anonim, 1979). Buah bulat telur / agak bulat, biji hitam, jorong bersudut tiga tidak beraturan dan sedikit berbentuk kerucut, panjang 3 mm.

Klasifikasi *N. sativa* dalam taksonomi tumbuhan sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Klas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Ranunculales
Suku	: Ranunculaceae
Marga	: Nigella

Tanaman *N. sativa* mengandung zat-zat lemak, protein, kalium, melantin (saponin), nigellin (zat pahit), nigelon, zat samak dan timokinon (Anonim, 1985), minyak atsiri yang komponen penyusunnya terdiri dari karvon, limonene, dihidrokarvon, dihidrokarveol, asetaldehid, furol, karvektol, pinen, felandren, simen, terpen-terpen (Mardisiswoyo and Rajakmangunsudarso, 1985), timokuinolin dan ditimokuinon (Joones, 2000)

*N. sativa* secara empiris telah digunakan sebagai obat untuk penyembuhan difteri, tetanus, radang anak telinga, batuk, batuk rejan (Mardisiswoyo and Rajakmangunsudarso, 1985). Dari hasil penelitian Mouhajir *et al.*, (1999) *Nigella sativa* mempunyai efek antimikrobia (*Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei* dan *Staphylococcus aureus*). Efek lain yang dimiliki *Nigella sativa* adalah antiinflamasi dan analgetik (Al Ghamdi *et al.*, 2001) dan antikanker dengan mekanisme sebagai antiangiogenik. *Nigella sativa* juga menstimulasi sistem imun (Joones, 2000).

Di Saudi Arabia dan negara-negara tetangganya, minyak *N sativa* digunakan secara topikal pada sakit persendian dan kaku sendi. Houghton *et al.*, (1995 dalam Randhawa *et al*, 2002) melaporkan bahwa minyak *N sativa* (*crude fixed oil*) dan senyawa aktifnya yaitu timokuinon menghambat jalur siklooksigenase dan 5-lipooksigenase dari metabolisme arachidonat pada leukosit rongga peritoneal tikus. Efek ini ditunjukkan dengan penghambatan yang tergantung pada dosis dari pembentukan thromboxan B2 dan leukotriene B4.

Efek ini selanjutnya dikonfirmasi oleh kajian eksperimental pada hewan



dan Al Ghamdi memakai suspensi aqueous biji *N sativa*. Dari ke-2 kajian di atas, maka terjadi penghambatan pembentukan udem pada kaki belakang tikus dan efek ini dapat diperbandingkan dengan pemberian indomethacin dan aspirin secara berurutan. Al Ghamdi juga melaporkan efek analgesik suspensi aqueous biji *N sativa* dibandingkan dengan aspirin dan diukur dengan uji *hot plate* pada tikus (Randhawa *et al*, 2002).

Mekanisme efek analgesik dan antiinflamasi ini nampaknya terkait dengan penghambatan sintesis eicosanoid seperti yang diusulkan oleh Houghton *et al.*, (1995 dalam Randhawa *et al.*, 2002). Kemungkinan lain dari aksi analgesik ini adalah aktivasi supraspinal reseptor subtype  $\mu(1)$  dan kappa-opioid yang dikeluarkan oleh efek antagonistic naloxone, naloxonazine dan nornalorphinine terhadap efek antinosiseptif minyak *N sativa* dan timokuinon.

Aktivitas antikanker *N sativa* pertama kali dilakukan oleh El-Kadi dan Kandil (1986) yang mengamati peningkatan aktivitas *natural killer cells* 200-300% pada pasien kanker yang memperoleh program imunoterapi multimodal dengan *Nigella sativa* sebagai salah satu komponennya. Selanjutnya efek anti kanker *N sativa* diteliti lebih lanjut *in vitro* memakai *cancer cell lines* dan *in vivo* memakai hewan coba (Randhawa *et al.*, 2002).

Penggunaan secara topikal ekstrak *N sativa* dan *Crocus sativus* menghambat tahap inisiasi dan promosi (dimethylbenz-a-anthracen/croton oil) karsinogenesis kulit pada mencit dengan menunda onset pembentukan papilloma dan mengurangi jumlah papilloma pada tiap mencit. Ekstrak ini juga menghambat

Lebih jauh, senyawa aktif *N sativa* yang mengandung asam lemak menunjukkan 50% aktivitas sitotoksik secara *in vitro* terhadap Ehrlich ascites carcinoma (EAC), Dalton's limfoma Ascites dan sel-sel sarkoma-180, secara *in vivo* menghambat perkembangan tumor EAC secara sempurna pada mencit (Randhawa *et al.*, 2002).

Timokuinon dan ditimokuinon adalah senyawa aktif *N sativa* yang mempunyai efek sitotoksik terhadap *parental and multi drug resistant cell lines tumor* manusia dengan lebih dari 10 kali lipat lebih resisten terhadap doxorubicin dan etoposide. Timokuinon juga mengurangi insidensi dan multiplisitas tumor lambung yang diinduksi benzo-a-pyrene pada mencit betina galur Swiss albino sebanyak 70% dan 67%. Fraksi kolom kromatografi etil asetat (CC-5) ekstrak etanol *N sativa* juga menunjukkan efek sitotoksik terhadap bermacam-macam kelas cell lines kanker seperti Hep G2, Molt 4 dan sel karsinoma paru Lewis (Randhawa *et al.*, 2002).

CC-5 dan alfa hedrin (AH) yang diisolasi dari CC-5 menghasilkan kecepatan penghambatan tumor yang tergantung pada dosis yang dapat diperbandingkan dengan kelompok yang diberi siklofosamid. Demikian halnya dengan timokuinon menghambat fibrosarcoma yang diinduksi oleh 20-metilcholantren pada mencit (Randhawa *et al.*, 2002).

El sayed dan Fukushima (2003) mengkaji efek kemopreventif *volatil oil N sativa* terhadap induksi dan perkembangan *aberrant crypt foci* (ACF), suatu lesi

Penelitian **Tasminatun *et al.*, (2005)** menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji *N. sativa* mempunyai efek kemopreventif pada terjadinya kanker kulit mencit yang diinduksi oleh sinar ultraviolet yang ditandai dengan menurunnya insidensi

### BAB III

#### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN II

##### A. TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kemopreventif ekstrak etanolik *N. sativa* pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA melalui pengamatan aktifitas enzim Glutathion-s-transferase dan menganalisis mutasi gen *p53* dan *ras* pada proses mutagenesis.

##### B. MANFAAT

1. Memberikan dukungan ilmiah untuk penelitian lebih lanjut bagi pengembangan *Nigella sativa* sebagai agen kemopreventif untuk kanker payudara.
2. Apabila ekstrak etanolik biji *N. sativa* terbukti dapat dipakai sebagai agen kemopreventif yang rasional, aman dan selektif, maka hal ini akan sangat membantu pemerintah dalam mengatasi penyakit keganasan terutama pada masyarakat ekonomi lemah dan secara ekonomi akan sangat menguntungkan karena merupakan usaha penghematan yang besar dan memperkaya khasanah ilmu pengetahuan pada umumnya di Indonesia.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Pembuatan Ekstrak etanolik biji *N. sativa*

##### 1. Identifikasi tanaman

Biji *N. sativa* yang digunakan dalam penelitian dideterminasi di Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Determinasi dilakukan untuk mencegah terjadinya kesalahan pengambilan obyek uji. Hasil determinasi terlampir.

##### 2. Pembuatan ekstrak etanolik *N. sativa*

Biji *N. sativa* yang sudah kering diserbukkan dengan mesin penggiling. Serbuk biji diekstraksi menggunakan etanol 96 % dengan metode maserasi sesuai Farmakope Indonesia edisi III. Metode ini dipilih dengan pertimbangan selama proses ekstraksi tidak memerlukan pemanasan, sehingga kerusakan bahan-bahan yang termolabil dapat dihindari. Selanjutnya ekstrak etanolik diuapkan dengan menggunakan penangas air untuk menghilangkan cairan penyari (etanolik) hingga diperoleh ekstrak kental.

#### B. Uji efek ekstrak etanolik *N. sativa* pada aktifitas enzim Glutathion-s-transferase (GST)

##### 1. Perlakuan pada Hewan Percobaan

Duapuluh lima tikus betina galur SD umur 4 minggu dikandangkan dalam

kondisi dan pakan yang sama. Sebelum digunakan untuk penelitian tikus diadaptasikan selama 1 minggu di kandang pemeliharaan. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok yaitu

Kelompok I merupakan kelompok kontrol positif, yang diberi DMBA dalam minyak jagung dengan dosis 20 mg/kg BB, peroral seminggu 2 kali sebanyak 9 kali.

Kelompok II, III dan IV merupakan kelompok perlakuan dosis ekstrak 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB 1 minggu sebelum dan selama inisiasi DMBA. Tikus diberi DMBA dengan dosis, cara dan frekuensi pemberian sama dengan kelompok I.

Kelompok V merupakan kelompok kontrol negatif, tikus tidak mendapat perlakuan apa-apa.

## **2. Pemurnian enzim GST**

Satu hari setelah pemberian ekstrak yang terakhir, tikus dipuasakan selama 24 jam. Tikus didekapitasi dan organ liver diambil untuk uji aktivitas enzim GST. Hepar ditimbang dan dimasukkan dalam NaCl fisiologis dingin. Masing-masing hepar ditambah dengan loading buffer (10 mM Tris HCl pH 7,9; 10 mM NaCl ; 1 mM DTT) dingin sesuai berat hepar (1:1). Hepar dihomogenkan dengan blender dingin berkecepatan 440 rpm. Homogenat hepar tersebut disentrifugasi dengan kekuatan 17.000 rpm pada suhu 4<sup>0</sup> C selama 60 menit untuk mengendapkan runtunan sel, inti, dan mitokondria dari supernatan. Supernatan yang mengandung

Pemurnian GST dari fraksi sitosol yang telah diperoleh, menggunakan resin yang dapat mengikat GST, yaitu Glutathione Sepharose 4B. Resin (100 $\mu$ l) dalam tabung ependorf 1,5 ml, disentrifuge dengan sentrifuge dingin suhu 4<sup>o</sup> C kecepatan 1000 rpm selama 1 menit. Supernatannya dibuang, kemudian ditambahkan pada residu tersebut, fraksi sitosol dari hepar tikus (200 $\mu$ l), digojog dengan membolak-balikkan tabung selama  $\pm$  1 menit, didiamkan selama 5-10 menit. Lalu disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 1 menit. Supernatannya dibuang, dicuci dengan buffer fosfat sebanyak tiga kali dan dengan akuades satu kali. Kemudian pada endapan ditambahkan dapar sampel dan disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 1 menit. Supernatannya diambil dan dielektroforesis menggunakan SDS-PAGE.

### 3. Elektroforesis GST menggunakan SDS PAGE

Lempeng kaca yang telah dibersihkan dengan etanol dan dipasang pada alatnya, diisi dengan gel pengisi dan penumpuk yang telah terlebih dahulu dibuat dengan komposisi seperti tercantum dibawah ini :

Akrilamide 10 %	Gel Pemisah	Gel Penumpuk
Akrilamide/ bisakrilamid 30 %	5,0 ml	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,6	3,4 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	2,0 ml
Aquades steril	5,1 ml	4,65 ml
SDS 10 %	148 $\mu$ l	85 $\mu$ l
Amonium persulfat 10 %	100 $\mu$ l	75 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l

Sampel GST yang telah dimurnikan dilarutkan dalam dapar sampel (1:1), di vortex. Campuran dipanaskan pada suhu 95-100<sup>o</sup>C (penangas air) selama 5

..... GST ..... GST faksi hepar

tikus kelompok kontrol negatif, kontrol positif DMBA dan kelompok perlakuan ekstrak dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB. Sampel sebanyak 5  $\mu$ l dimasukkan ke dalam sumuran yang telah terbentuk pada gel penumpuk. Alat elektroforesis dihubungkan dengan power supply dan dijalankan dengan voltage 100 volt.

### C. Uji efek ekstrak etanolik *N. sativa* pada mutasi Gen *p53* dan *ras*

#### 1. Perlakuan pada Hewan Percobaan

Tigapuluh tikus betina galur SD umur 4 minggu dikandangkan dalam kandang plastik yang ditutup dengan anyaman kawat. Tikus dipelihara dengan kondisi dan pakan yang sama. Sebelum digunakan untuk penelitian tikus diadaptasikan selama 1 minggu di kandang pemeliharaan..Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dan diberi perlakuan sama dengan hewan percobaan untuk uji aktivitas GST. Pada minggu ke- 10 setelah inisiasi DMBA terakhir tikus didekapitasi, organ payudara diambil untuk dilakukan analisis mutasi pada gen *p53* dan gen *ras*.

#### 2. Isolasi DNA

Diperlukan isolasi DNA payudara dari jaringan yang telah disimpan sebagai *frozen section* untuk determinasi status mutasi gen *p53* dan *ras*. Diambil 60-80 mg jaringan payudara diletakkan pada petri dish dengan menambahkan media kultur, jaringan dipotong menjadi dua. Jaringan dimasukkan ke dalam dua tube steril, disentrifuge 1500 rpm pada suhu 4  $^{\circ}$ C selama 2 menit. Supernatan diambil, dicuci



dalam 2,06 ml DNA buffer. Ditambahkan 100  $\mu$ l larutan proteinase K (10 mg/ml) dan 240  $\mu$ l 10 % SDS, digoyang perlahan dan diinkubasi semalam pada waterbath 45  $^{\circ}$ C . Ditambahkan 2,4 ml fenol digoyang 5-10 menit dan disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit pada 10  $^{\circ}$ C. Supernatan diambil dengan pipet dipindahkan ke tube baru, ditambahkan 1,2 ml fenol dan 1,2 ml chloroform/ isoamyl alkohol (24:1), digoyang dengan tangan selama 5-10 menit, disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit pada 10  $^{\circ}$ C. Supernatan diambil dengan pipet dipindahkan ke tube baru, ditambahkan 25  $\mu$ l 3 M sodium asetat (pH 5,2) dan 5 ml etanol, digoyang dengan tangan sampai DNA presipitasi. DNA dipindahkan pada tube baru. dicuci dengan 70 % etanol dan segera dikeringkan. Selanjutnya DNA dilarutkan dalam 0,5- 1 ml aquades steril, dibiarkan selama semalam, diletakkan pada shaker rotasi dengan suhu 4 $^{\circ}$ C. Pengukuran konsentrasi DNA dengan Spektrofotometer dan dimasukkan pada 1 % gel agar sebanyak 200 mg.

### 3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Ke dalam tabung mikrosentrifugasi polipropilen 0,2 ml, masukkan: 500 ng DNA genom; 30 pmol oligonukleotide primer yang sesuai ; 16  $\mu$ l 1.25 mM, 4dNTP 1.25 mM (0.2 mM); 10  $\mu$ l 10X *Taq buffer* ; 2.5 U of *Taq DNA Polymerase*; akuades steril sampai 100  $\mu$ l. Perlakukan pada kondisi: tahap inisiasi 5 menit, 94 $^{\circ}$  C; tahap *Melt* 50 detik, 94 $^{\circ}$ C; tahap *Annealing* 50 detik 94 $^{\circ}$  C, 45

**Primer untuk gen *H ras* (Sugiura *et al.*, 2003):**

Primer ras exon 1 forward : GAG CTC CTG GTT TGG CAA CC  
reverse : GGC AGG TAG TCA GAG CTC AC

Primer ras exon 2 forward : AGG ACC CTT AAG CTG TGT TC  
reverse : CAC CTG TAC TGA TGG ATG TC

**Primer untuk gen *p53* (Sugiura *et al.*, 2003):**

Primer ras exon 5-1 forward : CGC TGA CCT TTG ATT CTT TC  
reverse : GTC TCA CGA CCT CAG TCA TG

Primer ras exon 5-2 forward : CTC CAC ACC TCC ACC TGG TA  
reverse : AGT TCT AAC CCC ACA GCA GT

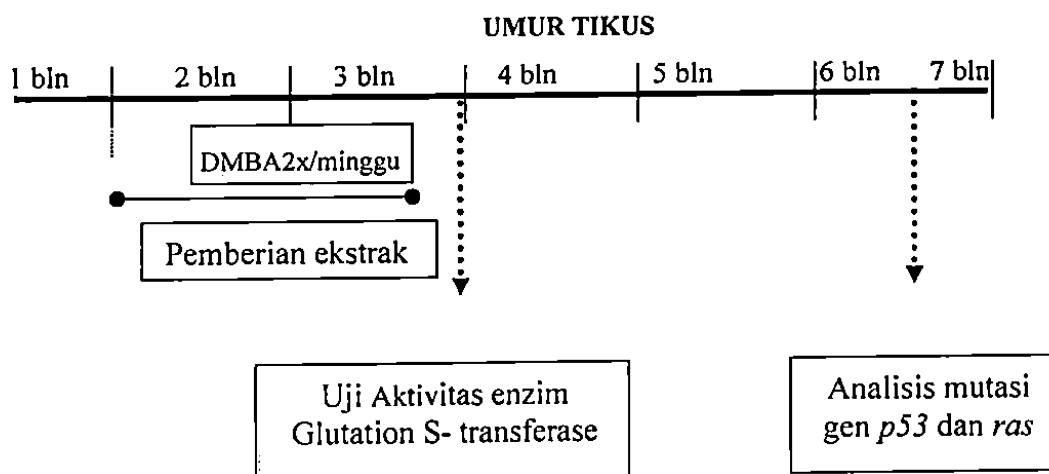
#### **4. *Single Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP).**

Mempersiapkan plate gelas 8 x 10 cm yang dibersihkan dengan deterjen, air dan etanol, dimasukkan spacers (tebal 0,75 mm) dan ditutup seal di samping dan di bawah dengan penutup tahan air. Menyiapkan larutan gel 8% acrylamide – 10% glycerol nondenaturing gel 8 ml. Campuran sebagai berikut : 2,6 ml 25% (49:1) polyacrylamide stok larutan, 0,8 ml 5X TBE buffer pH 7,5, 1 ml 80% glycerol, 3,6 ml aquadestilata, 80 µl 10% APS. Mempersiapkan stok larutan acrylamide-bisacrylamide 25% (49:1) : acrylamide 24,5 g, bisacrylamide 0,5 g, aquades 100 ml. Dipanaskan 55<sup>0</sup>C dalam gelas beaker, ketika dilarutkan ditambahkan air 100 ml total volume. Larutan disaring dengan kertas wattman 3MM, didiamkan selama 1 minggu pada 4<sup>0</sup>C pada botol gelap. Ditambahkan glycerol, 10% APS (Ammonium persulfat) dibuat segar selama seminggu pada 4<sup>0</sup>C. Ditambahkan 8 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametythylenediamine), kemudian dipanaskan 90<sup>0</sup>C, tuang secepatnya dan hilangkan gelembung udara.

bagian atas dan bawah dari tangki, gelembung udara yang terbentuk dihilangkan dengan menggunakan jarum suntik (Tullo dan Sbisa, 2002).

Dicampurkan 5  $\mu$ l hasil PCR (300ng) dengan 2  $\mu$ L 1% Natrium deoksikolat, 2  $\mu$ L EDTA 0.11 M pH 7.5, dan 5  $\mu$ L loading buffer. Sampel dipanaskan selama 5 menit, selanjutnya sampel dipindahkan secepatnya pada es untuk mencegah rantai DNA mengalami *reannealing*. Sampel, kontrol positif dan negatif dimasukkan ke lapisan *non denaturing gel*. Running selama 1 sampai 4 jam, tergantung pada ukuran fragmen dan konsentrasi gel, pada 200 V. Selama running, suhu internal bufer dijaga pada suhu 20<sup>0</sup> C. Setelah selesai, power supply dimatikan, dan gel diambil dari plate, lalu gel diwarnai dengan Etidium Bromid (Tullo dan Sbisa, 2002).

Skema kerja uji aktivitas enzim GST, analisis mutasi gen *p53* dan *ras*:



#### D. Analisis hasil

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan metode Anava satu

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dikerjakan untuk mengetahui efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *Nigella sativa* pada kanker payudara tikus yang diinduksi senyawa kimia 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) melalui pengamatan molekuler farmakodinamik, yaitu mengamati aktifitas enzim Glutathion-s-transferase yang dimobilisasi metabolit DMBA dan menganalisis mutasi gen *p53* dan *ras*. Pemberian ekstrak dilakukan satu minggu sebelum inisiasi, selama inisiasi hingga satu minggu setelah inisiasi DMBA yang terakhir. DMBA diberikan 2 kali seminggu sebanyak 9 kali dengan dosis 20 mg/kgBB. Ekstrak etanolik biji *Nigella sativa* diberikan satu kali setiap hari melalui oral dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB. Dosis ini didasarkan pada penelitian tahun pertama yang menunjukkan penurunan insidensi dan *tumour multiplicity* terjadi pada dosis ekstrak 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB. Dosis 800 mg/kgBB menunjukkan efek yang lebih rendah, sehingga digunakan dosis tertinggi sebesar 600 mg/kgBB (Tasminatun *et al.*, 2006).

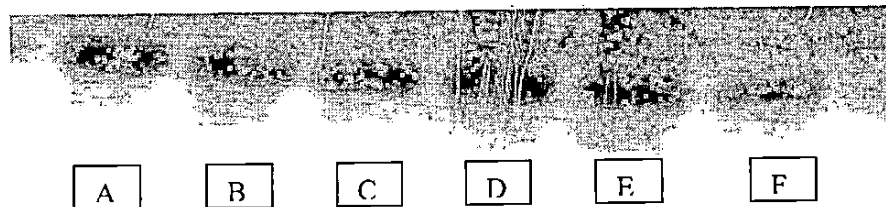
#### A. Ekstrak etanolik Biji *Nigella sativa*

Identifikasi penting dilakukan untuk mengetahui bahwa bahan utama yang diteliti benar-benar biji *N sativa* serta menghindari kesalahan dalam pengumpulan



mendetoksifikasi senyawa itu sendiri dan berakibat tidak terjadi tumor apabila diberikan hanya satu kali atau beberapa kali tetapi dengan selang waktu yang lama. Pemberian *multiple dose carcinogen* lebih meningkatkan insidensi atau frekuensi terjadinya tumor payudara daripada pemberian *single dose carcinogen* (Kubatka *et al.*, 2002).

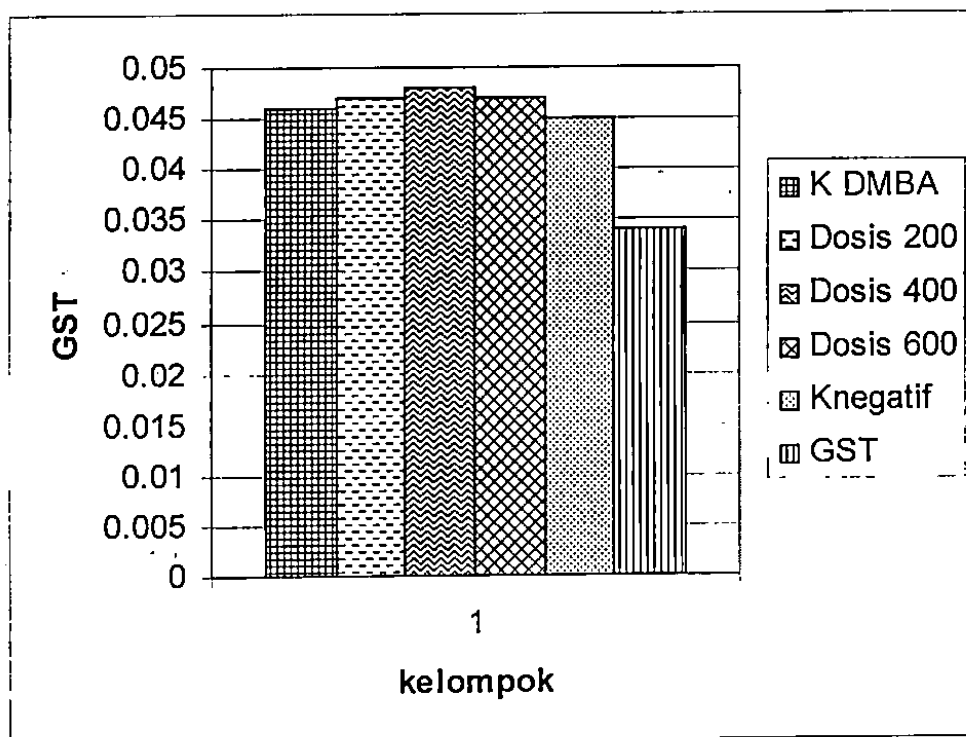
Satu hari setelah pemberian ekstrak yang terakhir, tikus dipuasakan selama 24 jam. Tikus didekapitasi dan organ liver diambil untuk uji aktivitas enzim GST. Hasil elektroforesis menggunakan SDS PAGE berupa gel yang mengandung pita-pita protein GST discan dan dianalisis dengan bantuan program adobe photoshop. Hasil elektroforesis ekspresi enzim GST dapat dilihat pada Gambar 2. Ekspresi enzim GST setelah pemberian ekstrak etanolik biji *Nigella sativa* dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 2.



**Gambar 2. Hasil elektroforesis enzim GST (A. K DMBA B. Ekstrak 200 mg/kgBB C. Ekstrak 400 mg/kgBB D. Ekstrak 600 mg/kgBB E. K negatif F. GST standar)**

Tabel 1. Rata-rata ekspresi enzim GST

KELOMPOK	EKSPRESI ENZIM GST
K DMBA	0.046 ± 0.011
Nigella 200	0.047 ± 0.019
Nigella 400	0.048 ± 0.019
Nigella 600	0.047 ± 0.011
K negatif	0.045 ± 0.007

Gambar 3. Ekspresi enzim GST setelah pemberian ekstrak etanolik biji *N sativa*

Ditinjau dari rata-rata ekspresi enzim glutation S transferase (GST)

... GST ...

etanolik biji *N sativa* lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan. Ekspresi GST kelompok ekstrak etanolik biji *N sativa* lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol DMBA. Hasil analisis statistik ekspresi GST dengan anava satu jalan dilanjutkan uji Tukey menunjukkan ekspresi GST antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna. Penelitian Meiyanto (2004) membuktikan bahwa senyawa yang meningkatkan ekspresi GST berfungsi sebagai agen detoksifikasi DMBA sehingga dapat mencegah mutasi onkogen. Senyawa aktif dalam ekstrak etanolik biji *N sativa* mempunyai efek kemopreventif tidak melalui jalur peningkatan ekspresi enzim GST.

Senyawa kemopreventif berefek melalui dua jalur yaitu *blocking agent* dan *suppressing agent*. *Blocking agent* mencegah karsinogen mencapai target aksinya, baik melalui penghambatan aktivasi metabolisme atau menghambat interaksi dengan target makromolekul seperti DNA, RNA atau protein. *Supressing agent* menghambat pembentukan *malignant* dari sel yang telah terinisiasi pada tahap promosi atau progresi (Surh, 1999).

Sebagai *blocking agent*, senyawa aktif dalam biji *N.sativa* mencegah metabolisme DMBA menjadi metabolit aktif. Pada pemberian per-oral, DMBA akan diaktivasi oleh enzim sitokrom P-450 di hepar sehingga akan terbentuk suatu epoksida yang merupakan zat antara pada metabolit DMBA yang sangat reaktif secara kimia. Kereaktifan zat ini dapat menyebabkan struktur protein, DNA dan RNA termodifikasi sehingga dapat mengakibatkan perubahan fungsi dari makromolekul tersebut. Setelah terbentuk epoksida, dengan bantuan enzim hidrase epoksida, akan terbentuk *proximate carcinogen* yang akan dioksidasi lagi



oleh enzim sitokrom P-450 menjadi metabolit karsinogen yang disebut *ultimate carcinogen*.

*Ultimate carcinogen* atau metabolit karsinogenik ini bersifat elektrofilik sehingga mampu berinteraksi dengan makromolekul dalam tubuh yang bersifat nukleofilik seperti DNA, RNA dan protein. Interaksi ini akan membentuk suatu ikatan kovalen antara *ultimate carcinogen* atau metabolit karsinogenik dengan DNA sehingga dapat menyebabkan kesalahan replikasi DNA, hibridisasi sel dan perubahan pada kromosom. Interaksi ini juga dapat menyebabkan kesalahan replikasi dalam pembentukan pasangan basa pada saat replikasi DNA, sehingga sel akan mengalami mutasi dan mengakibatkan perubahan fungsi dari sel tersebut. Sehingga hal ini dapat menyebabkan sel normal berubah menjadi sel kanker akibat dari perubahan fungsi tersebut.

Sebagai *suppressing agent*, senyawa aktif dalam biji *N.sativa* menghambat perkembangan sel kanker pada tahap progresi. Penelitian Al Ghamdi *et al.* (2001) menunjukkan biji *N.sativa* mempunyai efek antiinflamasi dan analgetik. Senyawa yang mempunyai efek antiinflamasi dapat digunakan untuk menghambat terjadinya kanker. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa fitokimia yang mempunyai efek antiinflamasi berpotensi sebagai agen kemopreventif. Beberapa diantaranya adalah curcumin dalam *Curcuma longa* L., gingerol dalam *Zingiber officinale* dan capsaicin dalam *Capsicum annum* (Surh , 2002). Menurut Wilmana (1995) obat-obat antiinflamasi bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase atau *cyclooxygenase* (COX) sehingga pembentukan prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) terganggu.

Dua isoform siklooksigenase yang telah diidentifikasi adalah siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). Keduanya mengkatalisis sintesa prostaglandin dari asam arakidonat. COX-1 diekspresikan pada seluruh jaringan mamalia dan berperan penting pada proses fisiologis. Adapun COX-2 berperan pada proses inflamasi, induksi enzim dan terlibat pada beberapa kasus penyakit (Dubois *et al.*, 1998). Pada sejumlah kanker termasuk payudara, kolon, pankreas dan prostat terjadi over ekspresi COX-2. Kelebihan ekspresi COX-2 dan sintesis PGE<sub>2</sub> memperantarai transformasi sel epitel neoplasma dengan meningkatkan laju proliferasi dan metastasis (Davies *et al.*, 2002).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penghambat COX mampu menghambat proliferasi sel kanker. Dubois *et al.* (1996) menunjukkan pada kolon hewan pengerat (rodent) yang telah diberikan bahan karsinogen dan OAINS menunjukkan peningkatan 3 kali lipat durasi G1 dari siklus sel, penurunan kadar protein cyclin D1 dan penurunan aktivitas retinoblastoma kinase yang berhubungan dengan cdk 4.

Hasil analisis menunjukkan ekstrak etanolik biji *N. sativa* mengandung asam etil linoleat sebesar 0,91 %. Hasil penelitian sebelumnya, etil linoleat terkonjugasi (*Conjugated Linoleic acid /CLA*) mempunyai efek antikanker baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. CLA menghambat proliferasi beberapa sel line antara lain : Lung adenocarcinoma (A-427, SK-LU-1, A549), human glioblastoma dan MCF-7 estrogen reseptor positif. Penelitian *in vivo* juga menunjukkan CLA mempunyai efek antikanker dan antimetastasis (Kelly, 2001). Hal ini mendukung

hasil penelitian yaitu ekstrak etanolik biji *M. sativa* mempunyai efek menghambat

## BAB V

### KESIMPULAN

Penelitian efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *N. sativa* memperoleh kesimpulan bahwa ekstrak etanolik *N. sativa* yang diberikan 1 minggu sebelum inisiasi, selama inisiasi dan 1 minggu sesudah inisiasi DMBA pada kanker payudara tikus : ekstrak etanolik biji *N sativa* dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB tidak menunjukkan aktivitas enzim glutathion S transferase

## DAFTAR PUSTAKA

- Al Ghamdi MS, 2001. *The antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of Nigella sativa*, 55 : 379-382. Department of Pharmacology King Faisal University College of Medicine. [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com). Desember 2002
- Barletta, E., G. Gorini, P. Vinels, L. Miligi, L. Davico, G. Mugnai, S. Ciolli, F. Leoni, M. Bertini, G. Matullo, and A.S. Costantini. 2004. Ras gene mutations in patients with acute myeloid leukaemia and exposure to chemical agents. *Carcinogenesis* 25 : 5 , 749-755.
- Anderson,L.E., Boorman,G.A., Morris,J.,E., Sasser,L.,B., Mann,P.,C., Grumbein,S.L., Hailey,J.,R., Mc Nally.A., Sills,R.C.,and Haseman J.K., 1999, Effect of 13 week Magnetic Fields Exposure on DMBA-Initiated Mammary Gland Carcinomas in Female Sprague-Dawley Rats, *Carcinogenesis* 20 (8) , 1615-1620
- Backer, C.A., and van den Brink Jr., R.C.B., 1962, *Flora of Java*, vol. II, Published Under The Auspices of The Ryksherbarium, Leiden, 362-364, 424-425
- Brem, S.,MD, 1999, *Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial*, Moffitt Cancer Center & Research institute (<http://www.medscape.com/cancercontrol/1999/v06.n02.brem/cc0605.02.brem-01.html>)
- Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000; 14 (5): 323-8.
- Clemons,Mark., and Goss,Paul., 2001, Estrogen and The Risk of Breast Cancer, *N Engl J Med*, 344 (4) , 276 – 85
- Davies, G., Martin, L.A., Sacks, N. and Dowsett, M. 2002. Cyclooxygenase-2(COX-2), Aromatase and Breast Cancer: A Possible Role in for COX-2 Inhibitors in Breast Cancer Chemoprevention. *Ann Oncol.* 13. 669-78
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van de Putte, L.B., and Lipsky, P.E., 1998, Cyclooxygenase in Biology and Disease, *FASEB J.*, 12: 1063-1073
- El-Kadi A, Kandil O. 1986, Effect of *Nigella sativa* (the black seed) on immunity. Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Conference on Islamic Medicine, Kuwait. *Bull Islamic Med*; 4: 344-8.

- Jones, CLA.,2000. Herbal Aids For Cancer. *Nutrition Science News* dalam Chiro.org. www. Chiro.org.
- Hanahan,D.,and Weinberg, R.A.,2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100,57-70
- Hutapea J.R., 1994, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, jilid III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 29 – 30
- Iskander MN.,Song Y.,Coupar IM and Jiratchariyakul W., 2002, Antiinflammatory screening of the medicinal plant *Gynura procumbens*, *J Plant Foods Hum Nutr* 57 (3-4),233-244
- Kelly, ND,G.S., 2001, Conjugated Linoleic Acid : A Review, *Alternative Medicine Review* 2001 (Aug) ; 6(4).p 367-382
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, Pearson Education Ltd., London
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova M. and Cermakova M., 2002, Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.* , 51,633-640
- Leeson, C.R.,Leeson,T.S. and Paparo,A.A., 1989, *Textbook of Histology*, WB Saunders Company
- Liu, Z., Seth W, Kullman, David C, Bencic, Torton,M., Hinton,DE., 2003, *ras* oncogene mutations in diethylnitrosamine-induced hepatic tumors in medaka (*Oryzias latipes*), a teleost fish, *Mutation Research* 539, 43–53
- MacDonald,F.,and Ford, C.H.J., 1997, *Molecular Biology of Cancer*, Bios Scientific Publishers, Oxford
- Mashhadian,NV., & Rakhshandeh, H., 2005, Antibacterial and antifungal effects of *N. sativa* Extracts against *S. aureus*, *P. aruginosa* and *C. albicans*, *Pak J Med Sci* January-March 2005 Vol. 21 p. 1 47-52
- Meiyanto,E.,Susilowati,Sitarina,Arifin,I., 2004, Efek Antimutagenik ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA melalui induksi enzim GST hepar dalam *Seminar "Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia"* Yogyakarta.
- ... .. 2004, ... .. 52, ... .. and their functional analysis

- Rasmiati, P.S., 1999, Deteksi Dini Kanker Payudara *dalam* Seminar kanker Deteksi Dini Tumor Ganas dalam upaya Penanggulangan Kanker di RS Bethesda Yogyakarta
- Randhawa, M.A., Al-Ghamdi, MS., 2002, A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*, *Pakistan J. Med. Res.* Vol.41, No.2
- Singletary, K., Macdonald, C., and Wallig, M., 1997, The Plasticizer Benzyl Butyl Phtalate (BBP) Inhibits 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced rat Mammary DNA Adduct Formation and Tumorigenesis, *Carcinogenesis* 18 (8) 1669-1673
- Surh, Y., 1999, Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, *Mut Res*, 428, 305-327
- Surh, Y., 2002, Anti-tumor promoting potential of selected of spice ingredients - with antioxidative and anti-inflammatory activities : a short review, *Food and Chem. Tox.* 40, 1091-1097
- Surh, Y., 2003. Cancer Chemoprevention With Dietary Phytochemicals. *Nature Revs.* 3. ; 768-80
- Tasminatun, S., 2005, Efek antikarsinogenesis ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. setelah inisiasi pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA, *Tesis*, Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- Tasminatun, S., dan Makiyah, SNN, 2005, Efek ekstrak etanolik biji *Nigella sativa* pada mencit terinfeksi *Stafilococcus aureus*, *Laporan Penelitian*, Fakultas Kedokteran UMY, Yogyakarta.
- Tjindarbumi, D, dan Mangunkusumo, R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol* ; 32 (Supplement 1) ,17-21
- Tullo, A., and E. Sbisà. 2002. Molecular characterization of p53 mutations in primary and secondary liver tumors. *Diagnostic and Therapeutic perspectives. Molecular Biotechnology*, 21, 265-278.
- Velde CJH, 1999, Tumor Payudara *dalam* Velde CJH, Bosman FT, Wagener DJT, Onkologi, Edisi e-5, Panitia Kanker RSUP Dr Sardjito Yogyakarta, hal 467-92
- Wilmana, P.F., 1995. Analgetik-Antipiretik Analgetik Antiinflamasi Non Steroid dan Obat Pirai. dalam Ganiswara, S.G. (Ed.). *Farmakologi dan Terapi* Ed.

T A M P I R A N I



BAGIAN BIOLOGI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI UGM

Alamat : Sekip Utara Jogjakarta  
Telpon : 0274 542738, 902663

SURAT KETERANGAN  
Nomor : UGM/FA/36 /Ident/ III/2006

Yang bertanda tangan di bawah ini kepala Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM menerangkan bahwa :

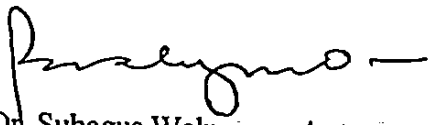
Nama : Sri Tasminatun, M.Si., Apt  
Universitas : Muhammadiyah Yogyakarta

telah mengidentifikasi sampel biji yang berasal dari jenis tumbuhan :

*Nigella sativa* L.

di Laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM.  
Pada tanggal 15 Maret 2006  
Surat keterangan ini dapat digunakan seperlunya.

Jogjakarta, 15 Maret 2006  
Bagian Biologi Farmasi  
Kepala

  
Dr. Subagus Wahyuono, Apt.  
NIP. 130604698

# Oneway

## Descriptives

GST

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
KDMBA	12	.04617	.010920	.003152
Dosis 200	12	.04667	.019213	.005546
Dosis 400	12	.04842	.018894	.005454
Dosis 600	12	.04717	.010786	.003114
K negatif	12	.04467	.006733	.001944
K GST	12	.03375	.004025	.001162
Total	72	.04447	.013532	.001595

## Descriptives

GST

	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
	Lower Bound	Upper Bound		
KDMBA	.03923	.05310	.028	.057
Dosis 200	.03446	.05887	.023	.081
Dosis 400	.03641	.06042	.028	.084
Dosis 600	.04031	.05402	.029	.065
K negatif	.04039	.04894	.032	.058
K GST	.03119	.03631	.028	.039
Total	.04129	.04765	.023	.084

## ANOVA

GST

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	5	.000	2.048	.083
Within Groups	.011	66	.000		
Total	.013	71			

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: GST

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
KDMBA	Dosis 200	-.000500	.005331	1.000
	Dosis 400	-.002250	.005331	.998
	Dosis 600	-.001000	.005331	1.000
	K negatif	.001500	.005331	1.000
	K GST	.012417	.005331	.197
Dosis 200	KDMBA	.000500	.005331	1.000
	Dosis 400	-.001750	.005331	.999
	Dosis 600	-.000500	.005331	1.000
	K negatif	.002000	.005331	.999
	K GST	.012917	.005331	.163
Dosis 400	KDMBA	.002250	.005331	.998
	Dosis 200	.001750	.005331	.999
	Dosis 600	.001250	.005331	1.000
	K negatif	.003750	.005331	.981
	K GST	.014667	.005331	.079
Dosis 600	KDMBA	.001000	.005331	1.000
	Dosis 200	.000500	.005331	1.000
	Dosis 400	-.001250	.005331	1.000
	K negatif	.002500	.005331	.997
	K GST	.013417	.005331	.134
K negatif	KDMBA	-.001500	.005331	1.000
	Dosis 200	-.002000	.005331	.999
	Dosis 400	-.003750	.005331	.981
	Dosis 600	-.002500	.005331	.997
	K GST	.010917	.005331	.327
K GST	KDMBA	-.012417	.005331	.197
	Dosis 200	-.012917	.005331	.163
	Dosis 400	-.014667	.005331	.079
	Dosis 600	-.013417	.005331	.134
	K negatif	-.010917	.005331	.327

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: GST  
Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
KDMBA	Dosis 200	-.01615	.01515
	Dosis 400	-.01790	.01340
	Dosis 600	-.01665	.01465
	K negatif	-.01415	.01715
	K GST	-.00323	.02806
Dosis 200	KDMBA	-.01515	.01615
	Dosis 400	-.01740	.01390
	Dosis 600	-.01615	.01515
	K negatif	-.01365	.01765
	K GST	-.00273	.02856
Dosis 400	KDMBA	-.01340	.01790
	Dosis 200	-.01390	.01740
	Dosis 600	-.01440	.01690
	K negatif	-.01190	.01940
	K GST	-.00098	.03031
Dosis 600	KDMBA	-.01465	.01665
	Dosis 200	-.01515	.01615
	Dosis 400	-.01690	.01440
	K negatif	-.01315	.01815
	K GST	-.00223	.02906
K negatif	KDMBA	-.01715	.01415
	Dosis 200	-.01765	.01365
	Dosis 400	-.01940	.01190
	Dosis 600	-.01815	.01315
	K GST	-.00473	.02656
K GST	KDMBA	-.02806	.00323
	Dosis 200	-.02856	.00273
	Dosis 400	-.03031	.00098
	Dosis 600	-.02906	.00223
	K negatif	-.02656	.00473

### Homogeneous Subsets

### GST

Tukey HSD<sup>a</sup>

kelompok	N	Subset for alpha = . 05
		1
K GST	12	.03375
K negatif	12	.04467
KDMBA	12	.04617
Dosis 200	12	.04667
Dosis 600	12	.04717
Dosis 400	12	.04842
Sig.		.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.