

## Potensi Antiproliferasi Jintan Hitam (*Nigella sativa*) pada Sel Lambung Tikus yang Diinduksi 7,12-Dimetil *Benzena Anthrasena*

(ANTIPROLIFERATION EFFECTS OF NIGELLA SATIVA IN GASTRIC CELL RATS  
INDUCED 7,12-DIMETHYL BENZ (A) ANTHRACENE)

Rizky Fariyah<sup>1,2</sup>, Hanif Nasiatul Baroroh<sup>1</sup>, Heny Ekowati<sup>1,2\*</sup>

1)Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan ilmu ilmu Kesehatan  
Universitas Jenderal Soedirman

2)Center of Excellence for Translational Research in Oncologi (CENTRO)

Jl. Dr. Soeparno Kampus Karangwangkal Purwokerto 53122

Telp/fax (0281) 642840

\*Corresponding author, email: heny240377@gmail.com

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi antiproliferasi ekstrak kloroform biji jintan hitam (*Nigella sativa*) pada sel lambung tikus betina yang diinduksi 7,12-dimetilbenz [a] antrasena (DMBA). Tikus betina galur *Sprague Dawley* dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor. Kelompok A adalah kontrol DMBA, kelompok B, C dan D, yaitu kelompok perlakuan ekstrak dengan dosis 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB dan kelompok E adalah kelompok kontrol dan hanya diberikan minyak jagung. Pengamatan histopatologi sel menggunakan pengecatan Hematoksilin-Eosin (H&E) dan aktivitas proliferasi sel diamati dengan pengecatan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region* (AgNOR). Nilai mAgNOR dianalisis menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, dilanjutkan uji satu arah (*one way*) sidik ragam/anova yang diteruskan dengan uji Tukey HSD. Hasil pewarnaan H&E dan nilai mAgNOR menunjukkan pemberian ekstrak kloroform biji *N. sativa* mampu mengurangi kerusakan sel lambung dan menurunkan proliferasi sel lambung pada tikus yang diinduksi DMBA. Hasil penelitian menunjukkan *N. sativa* berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada sel lambung dengan menurunkan proliferasi sel lambung.

Kata Kunci: jintan hitam, antiproliferasi, kanker lambung, 7,12-dimetilbenz(a) antrasena (DMBA).

### ABSTRACT

Studies have been conducted to determine the potential antiproliferative effect of *Nigella sativa* seed (NSS) extract on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced female rats. The chloroform NSS extract effect was observed on rat gastric cells. *Sprague Dawley* female rats were divided into five groups, each group consisted of 12 individuals. A control group was DMBA, Groups B, C and D were the groups treated with NSS extract with ranked dose 250 mg / kg, 500 mg / kg and 750 mg / kg and group E is the corn oil control group. Histopathological observation of cells using H&E staining and cell proliferation activity was observed with the mean AgNOR (mAgNOR). mAgNOR values were analyzed using Kolmogorov-Smirnov test, than followed with ANOVA one way, and Tukey test HSD. The results showed H&E staining and the chloroform extract showed mAgNOR *N.sativa* semen were able to reduced gastric cell damage and lower gastric cell proliferation in DMBA- induced rat. The results showed that *N.sativa* potential to develop as a chemopreventive agent in gastric cancer.

Keywords : *Nigella sativa*, antiproliferation, gastric cancer, 7,12-dimethyl benz(a) anthracene (DMBA)

### PENDAHULUAN

Kanker dapat tumbuh di semua jaringan tubuh seperti sel kulit, sel hati, sel darah, sel

otak, sel lambung, sel usus, sel paru, dan berbagai macam sel tubuh lainnya. Oleh karena itu, dikenal berbagai macam jenis kanker menurut sel atau jaringan asalnya (Djajanegara, 2009). *World Health Organization* (WHO)

melaporkan di Indonesia 13.494 orang meninggal dunia sepanjang tahun 2010. Kanker lambung merupakan tumor ganas epitel mukosa lambung dengan diferensiasi kelenjar. Patogenesis kanker lambung dipengaruhi oleh faktor lingkungan serta genetika inang. Sebagian besar karsinoma lambung berkembang dari gastritis kronik aktif mengarah ke gastritis atrofi dan metaplasia intestinal. Sel mengalami gangguan genomik dan fenotipe menjadi displasia yang diperkirakan berkembang menjadi karsinoma (Correa *et al.*, 2009). Sampai dengan saat ini strategi pengobatan dengan kemoterapi, radiasi dan pembedahan belum diperoleh hasil yang optimal. Hal tersebut mendorong penemuan agen yang mempunyai potensi sebagai antikanker. Salah satu di antaranya adalah jintan hitam (*Nigella sativa*). Jintan hitam merupakan salah satu tanaman yang secara empiris digunakan masyarakat dan mempunyai aktivitas sebagai antikanker (Mbarek *et al.*, 2007). Telah dibuktikan bahwa tanaman *N. sativa* mengandung 95,5% asam-asam lemak seperti asam linoleat (50%), asam oleat (25%), asam palmitat (12%), asam stearat (2,84%), dan asam miristat (0,35%) (Nickavar *et al.*, 2003; Ekowati *et al.*, 2011) yang kemungkinan besar mempunyai efek antiproliferasi (Ekowati *et al.*, 2011). Telah dibuktikan bahwa jintan hitam mempunyai aktivitas antikanker baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Telah dilakukan uji sitotoksik ekstrak petroleum eter dan kloroform jintan hitam terhadap sel MCF-7, sel HeLa dan sel wiDr dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing 164  $\mu$ g/mL, 161  $\mu$ g/mL; 402  $\mu$ g/mL, 267  $\mu$ g/mL dan 331  $\mu$ g/mL, 280  $\mu$ g/mL (Ningrum, 2011; Hendrawan, 2011; Amalia, 2011). Penelitian menggunakan hewan uji tikus menunjukkan bahwa jintan hitam berpotensi sebagai antiproliferasi serta dapat menghambat proses metastasis pada sel kanker (Gook-cho *et al.*, 2008)

Penelitian yang dilakukan oleh Ekowati *et al.* (2011) melaporkan bahwa ekstrak kloroform biji jintan hitam mempunyai aktivitas sitotoksik secara *in vitro* pada sel T47D Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek ekstrak kloroform biji jintan hitam secara *in vivo*. Pada penelitian ini dikaji efek antiproliferasi ekstrak kloroform biji jintan hitam terhadap sel lambung tikus betina yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA) sebagai agen penginduksi kanker.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan melewati tahapan sebagai berikut:

Determinasi tanaman jintan hitam (*Nigella sativa*). Determinasi dilakukan di Laboratorium Taksonomi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto untuk menentukan kebenaran bahan yang akan digunakan dalam penelitian.

Pembuatan serbuk simplisia. Bahan yang diambil adalah biji jintan hitam sebanyak 500 gram. Bahan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dalam oven pada suhu  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  dan dihaluskan menjadi serbuk kasar dengan cara ditumbuk menggunakan stamper dan mortir.

Pembuatan Ekstrak Kloroform Biji Jintan Hitam. Sebanyak 100 gram serbuk biji jintan hitam dimaserasi selama 1 x 24 jam dengan petroleum eter dengan perbandingan 1:6. Kemudian difiltrasi menghasilkan maserat dan residu, selanjutnya maserat diuapkan pada penangas air (*water bath*) sehingga didapat ekstrak petroleum eter biji jintan hitam. Sementara itu residu diangin-anginkan hingga kering kemudian dimaserasi dengan pelarut kloroform selama 3 x 24 jam dengan perbandingan 1:6. Residu dicampur dengan kloroform kemudian diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam pada wadah tertutup rapat. Setelah itu difiltrasi menggunakan corong Buchner, sehingga dihasilkan filtrat 1 dan residu. Selanjutnya residu dimaserasi sampai 3 hari, setiap hari dilakukan cara yang sama seperti filtrat 1 sehingga didapat filtrat 2 dan 3. Ketiga filtrat dievaporasi dan diuapkan di atas penangas air bersama-sama sehingga didapat ekstrak kental kloroform biji jintan hitam. Residu hasil maserasi menggunakan pelarut kloroform diangin-anginkan hingga kering kemudian dimaserasi dengan pelarut metanol selama 3 x 24 jam dengan perbandingan 1:6. Residu dicampur dengan metanol kemudian diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam pada wadah tertutup rapat. Setelah itu difiltrasi menggunakan corong Buchner, sehingga dihasilkan filtrat 1 dan residu. Selanjutnya residu dimaserasi sampai tiga hari, setiap hari dilakukan cara yang sama seperti filtrat 1 sehingga didapat filtrat 2 dan 3. Ketiga filtrat dievaporasi dan diuapkan di atas penangas air bersama-sama sehingga didapat ekstrak kental metanol biji jintan hitam.

### **Induksi karsinogenesis dengan DMBA dan perlakuan dengan ekstrak kloroform biji *N.sativa*.**

Tikus betina umur satu bulan, dibagi menjadi lima kelompok secara acak. Masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor tikus. Kelompok I merupakan kelompok kontrol positif, yang dibuat model kanker lambung dengan pemberian DMBA dalam minyak jagung dengan dosis 20 mg/kg BB secara peroral sebanyak 10 kali, yaitu seminggu dua kali selama lima minggu pada umur 1,5 bulan. Kelompok II-IV, yaitu kelompok perlakuan, diberi ekstrak kloroform biji jintan hitam dengan dosis 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB setiap hari selama 14 hari sebelum inisiasi dan selama inisiasi (pemberian DMBA). Dosis, frekuensi, dan cara pemberian DMBA sama dengan kelompok kontrol positif. Kelompok V merupakan kelompok kontrol negatif, tikus umur 1,5 bulan hanya diberi minyak jagung. Minyak jagung diberikan 10 kali, seminggu dua kali selama lima minggu. Tikus kelompok kontrol positif dan negatif selama 14 hari sebelum inisiasi DMBA hanya mendapat pakan kontrol. Pengamatan perkembangan tumor dilakukan setiap minggu selama 16 minggu setelah inisiasi (pemberian DMBA) yang terakhir. Pada akhir pengamatan tikus dikorbankan dan dilakukan nekropsi. Terhadap irisan histologi lambung dilakukan pewarnaan Hematoksin dan Eosin untuk melihat perubahan histopatologinya dan dilakukan pewarnaan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region* (AgNOR) untuk mengetahui aktivitas proliferasinya. Sampel lambung difiksasi dengan larutan formalin 10% sebelum dilakukan pengeblokan dengan parafin.

Pengecatan Hematoksin dan Eosin dan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, UGM Yogyakarta, sedangkan pemeriksaannya dilakukan di Laboratorium Mikro Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta di bawah mikroskop binokuler Olympus dengan perbesaran 1000x, Hasil pengamatan direkam dengan kamera digital Canon S-40.

### **Analisis data**

Data pengamatan *mArgyrophilic Nucleolar Organizer Region* dianalisis secara statistika dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, dilanjutkan dengan metode parametrik uji satu arah (*one way*) sidik ragam (anova) dengan taraf kepercayaan 95% yang diteruskan dengan uji Tukey HSD.

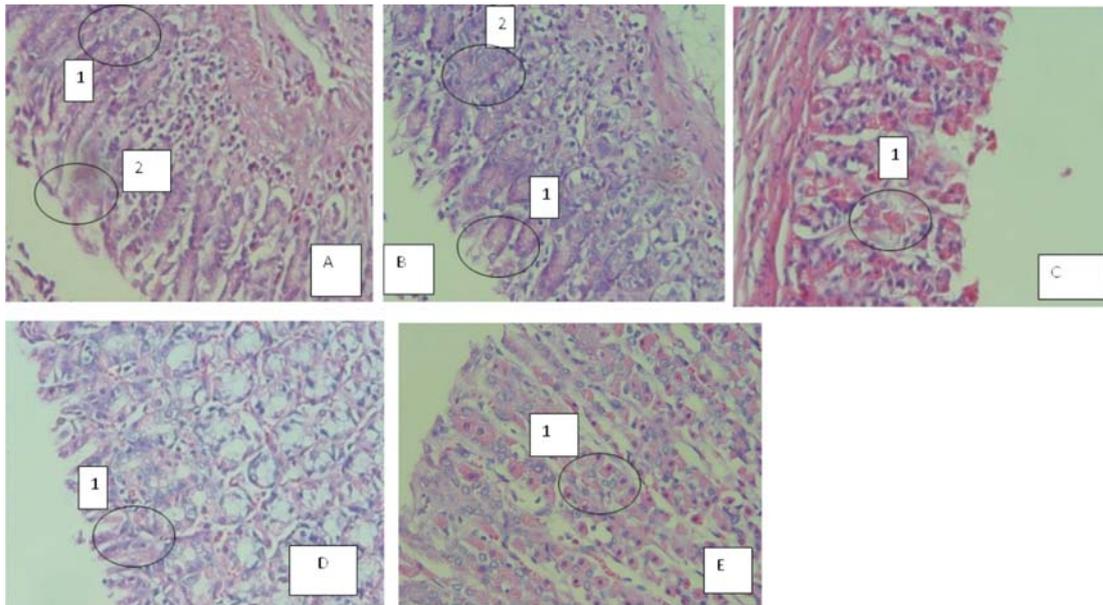
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Berdasarkan hasil nekropsi pada akhir minggu ke-16, secara makroskopis tidak ditemukan perubahan berupa kanker pada lambung tikus kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB maupun kelompok kontrol perlakuan yang ditunjukkan oleh gambaran morfologi organ lambung.

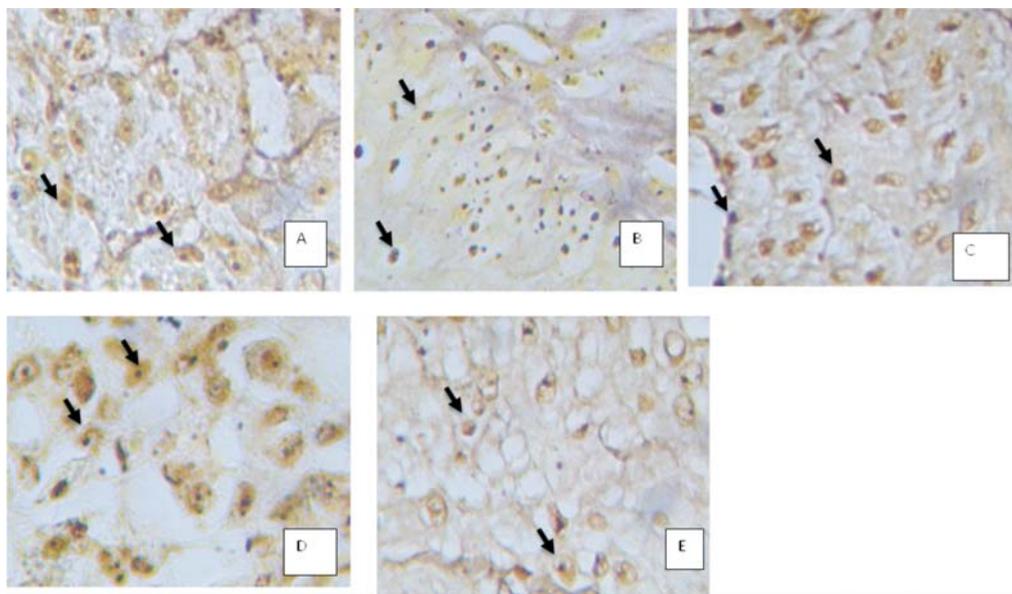
### **Ekstrak Kloroform Biji *N.sativa* Mampu Mengurangi Kerusakan Sel Lambung Tikus yang Diinduksi DMBA**

Hasil pemeriksaan secara makroskopis lambung tikus dari lima kelompok yaitu kelompok I kontrol DMBA, kelompok II dosis ekstrak 250 mg/kgBB, kelompok III dosis ekstrak 500 mg/kgBB, dan kelompok IV dosis ekstrak 750 mg/kgBB serta kelompok V kontrol minyak jagung tidak memperlihatkan perbedaan. Ukuran maupun keadaan lambung keempat kelompok tersebut dalam keadaan yang sama dan normal. Namun, pemeriksaan histopatologi sel lambung memperlihatkan adanya perubahan pada lambung. Pada pewarnaan Hematoksin dan Eosin ditunjukkan adanya perubahan yaitu seperti lisis sel, dan sebagian besar sel mengalami nekrosis pada epitel mukosa. Pada kelompok DMBA dan kelompok dosis ekstrak 250 mg/kgBB mengalami nekrosis epitel mukosa dan infiltrasi sel radang pada mukosa. Hasil pemeriksaan histopatologi pada kelompok dosis ekstrak 500 mg/kgBB dan kelompok dosis ekstrak 750 mg/kgBB dan kelompok kontrol minyak jagung menunjukkan sebagian besar jaringan lambung tikus normal tidak mengalami perubahan yang spesifik (Gambar 1).

Pada penelitian ini terlihat perubahan berupa infiltrasi sel radang, nekrosis pada sel epitel dan lisis pada mukosa. Lesi yang terjadi pada lambung akibat kontak antara lambung dengan karsinogen yang menyebabkan inisiasi sel menuju tumor maupun akibat rangsangan yang lama sehingga menyebabkan proliferasi sel berupa nekrosis epitel, hiperplasia, infiltrasi sel radang dan hiperkeratosis (Budi dan Widyaningrum, 2010), sesuai dengan yang ditemukan pada hasil penelitian ini. Kerusakan yang terjadi pada sebagian besar tikus adalah terjadinya inflamasi yaitu gastritis. Shao *et al.*, (2000) mengemukakan bahwa pemberian DMBA dapat menimbulkan gastritis yang secara patologi memperlihatkan adanya infiltrasi sel radang berupa neutrofil dan peningkatan sekresi



Gambar .1. Histopatologi jaringan lambung tikus pada kelompok kontrol dan perlakuan. Tikus dibagi dalam 5 kelompok, kelompok I (A<sub>1</sub>) sel lambung mengalami nekrosis ; (A<sub>2</sub>) sel lambung mengalami lisis; kelompok II (B<sub>1</sub>) sel mengalami lisis;(B<sub>2</sub>) sel mengalami nekrosis; kelompok III (C<sub>1</sub>) sel mengalami lisis epitel mukosa; kelompok IV (D<sub>1</sub>) keadaan sel sebagian besar normal; kelompok V (E<sub>1</sub>) keadaan sel epitel mukosa lambung sebagian besar dalam keadaan normal. Pada otopsi, organ lambung telah dipotong dan difiksasi dengan 10% buffered formalin. Jaringan diiris 3-5 ìm dimasukkan dalam parafin, dan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin(!=necrosis).Perbesaran 400x



Gambar II. Gambaran proliferasi pada sel lambung tikus dengan pengecatan AgNOR. Perbesaran 400x, *blackdot* ditunjukkan dengan panah. kelompok A : dalam sel memiliki 3,2 atau 1 *blackdot*; kelompok B: dalam 1 sel sebagian besar memiliki 2 atau 1 *blackdot*; kelompok C: dalam 1 sel sebagian besar memiliki 1 *blackdot* dan ada yang 2 *blackdot*; kelompok D: dalam 1 sel sebagian besar 1 *blackdot*; kelompok E: dalam 1 sel sebagian besar memiliki 1 *blackdot*

- (A) kelompok kontrol DMBA(20mg/kgbb dalam *corn oil*)
- (B) kelompok dosis ekstrak 250 mg/KgBB+DMBA
- (C) kelompok dosis ekstrak 500 mg/KgBB+DMBA
- (D) kelompok dosis ekstrak 750 mg/KgBB +DMBA
- (E) kelompok kontrol minyak jagung.

mukus. Senyawa reaktif tersebut dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi membran lipid dan kerusakan pada sel (Budi dan Widyarini, 2010). Terjadinya peradangan diperantarai oleh adanya enzim siklooksigenase (COX). Enzim COX terdiri dari dua isoenzim yaitu: COX-1 dan COX-2. Enzim COX-1 bersifat konstitutif untuk memelihara fisiologi normal dan homeostasis, sedangkan COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi (Leahy *et al.*, 2000). Enzim COX-2 juga berperan dalam proliferasi sel kanker. Overekspresi COX-2 ditemukan pada kebanyakan kanker (Simmons dan Moore, 2000). Senyawa DMBA dapat memicu terjadinya spesies oksigen reaktif (ROS)/ spesies nitrogen reaktif (RNS) atau spesies reaktif lain yang dapat menyerang DNA dan menyebabkan mutasi pada onkogen/ gen penekan tumor atau perubahan genetik lain yang akan mengarah pada inisiasi karsinogenesis (Simmons dan Moore, 2000). Prostaglandin dilaporkan berperan dalam upregulasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan menginduksi angiogenesis pada sel tumor (Akarasereenont *et al.*, 2002). Prostaglandin E2 (PGE2) dan PF2- $\alpha$  dapat meningkatkan bikarbonat gastrium dan produksi mukus untuk melindungi lambung dari keasaman tinggi dan enzim proteolitik. Penekanan produksi prostaglandin PGE2 akan menurunkan ekspresi bcl-2, yang merupakan suatu protein antiapoptosis (Shacter dan Weitzman, 2002).

Pada penelitian sebelumnya dilakukan fraksinasi ekstrak kloroform biji jintan hitam kemudian senyawa yang terkandung pada ekstrak tersebut diidentifikasi dengan menggunakan *Gas chromatography–mass spectrometry* (GC-MS). Senyawa yang diperoleh dari fraksinasi adalah asam linoleat, asam palmitat, dan senyawa indol yaitu triptamin yang merupakan alkaloid (Ekowati *et al.*, 2011). Asam linoleat yang terkandung dalam ekstrak kloroform jintan hitam merupakan senyawa yang mampu mengurangi proliferasi pada sejumlah kultur sel (Scimeca, 1999). Hasilnya terlihat pada gambaran histopatologi antara kelompok kontrol DMBA dan kelompok dosis ekstrak 750 mg/kgBB (Gambar 1). Sel lambung pada kelompok kontrol DMBA sebagian besar mengalami infiltrasi sel radang, nekrosis dan lisis sel epitel mukosa, sedangkan pada kelompok dosis ekstrak 750 mg/kgBB sel lambung tidak mengalami infiltrasi sel radang maupun nekrosis seperti pada kelompok kontrol DMBA. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Simopoulos (2008) yang melaporkan bahwa asam linoleat ( $\omega$ 3) dan asam linoleat  $\alpha$  ( $\omega$ 6) mampu memengaruhi ekspresi gen pada hewan uji, memiliki aktivitas antiinflamasi, mampu menekan interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6). Dengan demikian ekstrak kloroform biji jintan hitam mampu mengurangi peradangan dan nekrosis sel epitel yang terjadi pada sel lambung tikus.

Tabel 1. Efek ekstrak kloroform biji *N.sativa* terhadap aktivitas proliferasi sel lambung.

No.	Kelompok	Tikus	Nilai mAgNOR	Rataan $\pm$ SD
1	kontrol DMBA 20 mg/kgBB	A1	1,26	1,27 $\pm$ 0,023
		A2	1,30	
		A3	1,26	
2	dosis ekstrak 250 mg/kgBB	B1	0,93	0,96 $\pm$ 0,030
		B2	0,99	
		B3	0,95	
3	Dosis ekstrak 500 mg/kgBB	C1	0,86	0,91 $\pm$ 0,050
		C2	0,90	
		C3	0,96	
4	Dosis ekstrak 750 mg/kgBB	D1	0,89	0,78 $\pm$ 0,060
		D2	0,86	
		D3	0,88	
5	kontrol pelarut minyak jagung	E1	00,78	0,96 $\pm$ 0,17
		E2	0,72	
		E3	0,84	

### Ekstrak Kloroform Biji Jintan Hitam (*N. Sativa*) Mampu Menurunkan Proliferasi Sel Lambung Tikus yang Diinduksi DMBA

Pemeriksaan aktivitas proliferasi sel paru dilakukan dengan metode AgNOR karena metode ini cepat dan murah serta dapat dilakukan pada jaringan yang difiksasi secara konvensional. Dengan teknik pewarnaan AgNOR, protein yang berhubungan dengan NOR (RNA polymerase, protein B23, C23 atau nukleolin) dikode oleh gen yang ada pada NOR sehingga dapat dikenali sebagai titik hitam kecil pada nukleus (Lee *et al.*, 1999). Penghitungan AgNOR sebagai penanda proliferasi bermanfaat untuk diagnosis sitopatologi pada beragam bentuk kanker ganas / malignant, termasuk kanker lambung (Lee *et al.*, 1999 ; Bankfalvi *et al.*, 2002).

Aktivitas proliferasi dihitung dengan menggunakan metode mAgNOR yaitu dengan mengamati jumlah bintik hitam / *blackdots* tiap sel diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus, Japan) dengan perbesaran 1000x, kemudian dihitung mAgNOR yaitu menghitung rata-rata *blackdots* pada minimal 100 sel yang diamati. Semakin tinggi tingkat proliferasi maka semakin banyak titik hitam yang teramati (Rizali dan Auerkari, 2003). Karsinogenesis dengan DMBA dapat menyebabkan mutasi pada gen *ras* dan meningkatkan ekspresi *Ras* dan *fos* sehingga dapat memacu proliferasi sel (Limtrakul *et al.*, 2001).

Pada Gambar 2, disajikan gambaran proliferasi sel lambung menggunakan teknik pewarnaan AgNOR. Adanya titik hitam / *blackdots* (yang ditunjukkan dengan tanda panah) selanjutnya dihitung dengan metode mAgNOR.

Hasil pengamatan keadaan proliferasi sel dengan pewarnaan AgNOR terlihat adanya penurunan proliferasi antara kelompok kontrol DMBA, kelompok dosis ekstrak 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, 750 mg/kgBB dan kelompok kontrol pelarut minyak jagung. Nilai mAgNOR disajikan pada Tabel 1.

Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa tingkat proliferasi sel lambung pada tikus kelompok kontrol pada DMBA paling tinggi dan tingkat proliferasi untuk tikus pada pelarut minyak jagung paling rendah. Meskipun demikian tingkat proliferasi pada kelompok DMBA belum menunjukkan insidensi terbentuknya kanker. Pada keadaan jaringan normal nilai mAgNOR sebesar  $1,2 \pm 0,1$  dan pada jaringan yang menunjukkan terbentuknya kanker memiliki

nilai mAgNOR sebesar  $3,8 \pm 0,6$  atau lebih besar yaitu sebanyak  $4,8 \pm 1,1$  (Rizali dan Auerkari, 2003).

Nilai mAgNOR dari masing-masing kelompok dianalisis menggunakan uji non parametrik Kolmogorof-Smirnov. Berdasarkan hasil uji Kolmogorov-Smirnov data dapat dikatakan terdistribusi normal atau mewakili populasi dengan nilai Assymp. Sig. (2 tailed) sebesar 0,404 ( $> 0,05$ ). Data yang sudah terdistribusi normal kemudian dilanjutkan dengan sidik ragam/Anova. Data menunjukkan bahwa nilai mAgNOR dari kelima kelompok memiliki perbedaan yang signifikan. Analisis dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey HSD untuk melihat perbedaan antar kelompok. Hasil uji lanjut Tukey HSD menunjukkan bahwa nilai mAgNOR kelompok pelarut minyak jagung sangat berbeda dibandingkan dengan nilai mAgNOR kelompok DMBA, kelompok dosis ekstrak 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 750mg/kgBB.

Data homogenous subset pada hasil output SPSS digunakan untuk melihat nilai mAgNOR kelompok mana saja yang tidak berbeda secara signifikan. Pada subset 1 terlihat grup dengan anggota kelompok dosis 750 mg/kgBB dan kelompok minyak jagung, sehingga kedua kelompok tersebut tidak berbeda satu dengan yang lainnya.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak kloroform biji jintan hitam. Senyawa yang diperoleh dari fraksinasi tersebut adalah asam linoleat, asam palmitat, dan senyawa indol yaitu triptamin yang merupakan alkaloid (Ekowati *et al.*, 2011). Asam linoleat mampu mengurangi proliferasi sel kanker pada kanker paru, payudara, prostat dan kanker kolon (Manggiara *et al.*, 2004). Beberapa penelitian menyatakan bahwa asam linoleat mampu menghambat pembentukan DNA *adduct* diinduksi oleh paparan karsinogen seperti DMBA, mampu mengaktifkan ekspresi gen yang terlibat dalam transkripsi dan sinyal transduksi, menginduksi aktivasi *caspase* dan apoptosis pada sel tumor dan menghambat angiogenesis secara *in vivo* (Kritchevsky, 2000). Asam linoleat mampu menginduksi apoptosis melalui jalur *intrisik* (*mitochondrial pathway*). Mekanisme apoptosis dimulai dengan adanya kerusakan DNA dan peran protein p53. Protein p53 merupakan protein tumor *supressor* yang diaktivasi oleh adanya kerusakan DNA atau adanya *stres* tertentu pada sel. Asam linoleat mampu

menginduksi apoptosis dengan cara upregulasi dari protein proapoptosis *Bax* dan menurunkan regulasi dari protein antiapoptosis *Bcl-xL* sehingga aktivitas proliferasi sel dapat dikurangi (Grifúths *et al.*, 1999).

Asam linoleat mampu mengurangi proliferasi sel dengan mengurangi ekspresi *cyclin A* dan *cyclin D*. Kedua *cyclin* tersebut merupakan *cyclin* yang mengatur konversi dari fase G1 ke fase S pada siklus sel (Dong *et al.*, 2001). Asam linoleat juga mampu meningkatkan ekspresi protein p16 dan p27. Data tersebut menunjukkan bahwa asam linoleat mengurangi proliferasi sel dengan cara menghambat sintesis DNA dan menghambat protein-protein yang mengatur pada proses siklus sel (Futakuchi *et al.*, 2002). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform jintan hitam mampu mengurangi aktivitas proliferasi sel lambung tikus yang diinduksi DMBA. Efek antiproliferatif tersebut dapat mencegah progresi sel-sel kanker menjadi bentuk malignant (ganas).

### SIMPULAN

Pemberian ekstrak kloroform biji jintan hitam mampu mengurangi kerusakan sel lambung dan mampu menurunkan proliferasi sel lambung pada tikus yang diinduksi DMBA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jintan hitam berpotensi sebagai agen kemopreventif pada kanker lambung dengan menurunkan proliferasi sel lambung.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian toksisitas pada ekstrak kloroform biji jintan hitam (*N.sativa*) sehingga dapat digunakan sebagai agen kemopreventif.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Jenderal Soedirman dengan skim Penelitian Hibah Bersaing periode 2010 yang telah memberikan dukungan dana untuk penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Amalia I. 2011, Efek Sitotoksik Ekstrak Petroleum Eter dan Kloroform Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*) pada Kanker Kolon WiDr dan Pengaruhnya Terhadap Ekspresi Protein p53, Purwokerto, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran Dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirma.
- Akarasereenont PC, Techatraisak K, Thaworn A, and Chotewuttakorn S. 2002. The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase, *Mediators Inflamm*, **11** (1), 17-24
- Bankfalvi A, Giuffre G, Öfner D, Diallo R, Poremba C, Buchwalow IB, Barresi V, Bocker W, Tuccari G. 2002. Relationship between HER2 status and proliferation rate in breast cancer assessed by immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridisation and standardised AgNOR analysis, *International J. of Oncol*, **23**: 1285-1292
- Belury MA. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* **22**: 505-531.
- Budi Ranita Tri,M, Widayarni,S. 2010. Dampak Induksi Karsinogenesis Glandula Mammae dengan 7, 12-dimetilbenz[a]antrasen terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Tikus *Sprague Dawley*. *Jurnal Veteriner* , Vol. 11, No.1 :17-23
- Correa P, Camargo MC, Piazuelo MB. 2009. Overview and pathology of gastric cancer, In: *The biology of gastric cancers*. Wang TC, Fox JG, Giraud AS. Eds., Pp. 1-24, Springer Science + Business Media, Newyork.
- Djajanegara I, Wahyudi P. 2010. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Herbal Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) terhadap Sel T47D secara *In Vitro*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol 8(1), 41-47.
- Ekowati H, Rahmani EPN, Rastuti U. 2011. The Active Fraction From *Nigella sativa* and its activity against T47D cell line. *Indonesian Journal of Chemistry*,. **11**(3): 217-222

- Futakuchi M, Cheng JL, Hirose M, Kimoto N, Cho YM, Iwata T, Kasai M, Tokudome S, Shirai T. 2002. Inhibition of conjugated fatty acids derived from safûower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induce by 2 – amino – 1 – methyl – 6 phenylimidazo [4,5b] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.* 178:131–139.
- Gao J, Lauer FT, Mitchell LA, Burchiell SW. 2007. Microsomal Epoxide Hydrolase Is Required for 7,12-Dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) –Induced Immunotoxicity in Mice, *Toxicol.Sci*, Vol 98 (1), 137-144.
- Gilani AH, Jabeen Q, Khan MAU. 2004. A Review of Medicinal Uses and Pharmacological Activities of *Nigella sativa*, *Pakistan J Biol Sci*, Vol 7(4), 441-451.
- Grifûths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones N, Whitehouse J, Corfe BM. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis, *J. Cell Biol.* 144:903-914
- Gook Cho S, Yi Tifang, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Guang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M. 2008. Thymoquinone Inhibits Tumor Angiogenesis And Tumor Growth Through Suppressing AKT And Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways, *Molecular Cancer Therapeutics* 7(7): 1789–96.
- Hendrawan A. 2011. Aktivitas Sitotoksik Dan Induksi Apoptosis Ekstrak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*) Pada Sel Kanker Payudara MCF-7, Purwokerto, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman.
- Irawan, 2008. Hubungan Nilai AgNOR Pra Dan Pasca Kemoradiasi Dengan Respon Radiasi Pada Penderita Karsinoma Epidermoid Serviks Uteri Stadium Lanjut, Tesis, Program Pendidikan Dokter Spesialis I Obstetri Dan Ginekologi, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Dong Y, Thompson HJ, Bauman DE, Ip MM. 2001. Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer* 39:233–238.
- Kritchevsky D. 2000. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Br J Nutr* 83: 459-465.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. 2002. Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in Vivo, *Cancer Res* 62: 625–631
- Lee YC, Chern JH, Pan CC, Chang SC, Perng RP. 1999. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Cells of Thymoma and Thymic Carcinoma “Correlation with DNA Ploidy and Clinicopathologic Characteristic “ *Chest* 115 : 1115-1119.
- Limtrakul P, Anuchapreeda S, Lipigorngoson S, Dunn F W. 2001. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos protooncogenes expression by dietary curcumin, *BMC Cancer* 1 (1).
- Maggiara M, Bologna M, Ceru MP, Possati L, Angelucci A, Cimini A, Miglietta A, Bozzo F, Margiotta C, Muzio G, Canuto RA. 2004.:An overview of the effect of linoleic and conjugated linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *J Int Cancer* 112: 909-919.
- Mbarek LA, Mouse HA, Elabbaadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharrel A, Chait, A, Kamal, M, Dalal A, Ziad, A. 2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts, *Braz J Med Biol Res* Online Ahead of Print ISSN 0100-879X.
- Meiyanto E., Susilowati, S., Tasminatun S., Murwanti R., and Sugiyanto, 2007, Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus, *MFI*, 18(3): 154-161
- Ningrum SUDW. 2011. Efek Sitotoksik Ekstrak Petroleum Eter Dan Kloroform Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*) Pada Kanker Serviks (HeLa) Dan Pengaruhnya Terhadap Apoptosis. Purwokerto, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran Dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman.
- Nickavara B, Mojaba F, Javidniab K, Amolia MAR. 2003. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z. Naturforsch* 58 : 629-631.
- Raval BP, Shah GT, Patel JD, Patel AB, Patel KR, Suthar PM. 2010. Potent anticancer activity of *N. sativa* Seeds, *AASR*, 2 (1) 52-56, ISSN 0975-508X

- Rizali E, dan Auerkari Elza I. 2003. Teknik Pewarnaan Silver (AgNOR) Sebagai Salah Satu Cara Menentukan Aktivitas Proliferasi Sel Tumor dan Apoptosis, *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia*, 10(3) : 41-45.
- Shacter E, dan Weitzman SA. 2002. Chronic Inflammation and Cancer, *Oncology*, 16 (2) : 217-232
- Shao J, Sartor BR, Dial E, Lichtenberger LM, Schepp W, Alpers DH. 2000. Expression of intrinsic factor in rat and murine gastric mucosal cell lineages is modified by Inflammation. *Am J Pathol* 157(4):1197-1205.
- Simmons DL, dan Moore BC. 2000. COX-2 Inhibition, Apoptosis, and Chemoprevention by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, *Curr Med Chem*, 7: 1131-1144
- Simopoulos AP. 2008. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr*. 17:131-134
- Ward.J. *et al.* Gastric Dysplasia. *Lancet*. 1999. Januari 16 :353(9148) :221-6. Available from: <http://www.ams.ac.ir/AIM/0033/Commented0033.html>