

DAMPAK PEMBUATAN MODEL KARSINOGENESIS ORAL TERHADAP ESOFAGUS TIKUS SPRAGUE DAWLEY

Dewi Agustina*, Topan Laila **, Sitarina Widyarini***

*Bagian Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

***Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Dewi Agustina, Topan Laila, Sitarina Widyarini. Dampak pembuatan model karsinogenesis oral terhadap esofagus tikus sprague dawley. Indonesian Journal of Dentistry 2005; 12(3):152-158.

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of 4NQO oral induction in oesophagus of male rats. Sixteen male Sprague Dawley rats were divided into three experimental groups and one untreated group as control. The experimental groups were applied with 0.5% 4-nitroquinoline 1-oxide on the dorsal mucosa of tongue thrice weekly for 8, 16 or 24 weeks, one brush stroke per application. At the end of the 36th week, all rats were sacrificed and the tongue and oesophagus were excised and fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. The H&E sections were prepared for histological examination. The microscopical assessment showed that all rat tongues whether applied with 4NQO for 8, 16 or 24 weeks were identified having Squamous Cell Carcinoma (SCC). Microscopical examination of oesophagus indicated that 75% of the rats applied with 4NQO for 16 weeks showed hyperkeratosis, and 80% and 20% of the rats applied with 4NQO for 24 weeks showed malignancy changes and hyperkeratosis, respectively. No histological changes were detected either in the tongue or the oesophagus of the control rats. It was concluded that the effect of carcinogenic induction in oral mucosa caused malignant changes in oesophagus.

Keywords: 4NQO, Sprague Dawley rat, oesophagus, histological changes

Pendahuluan

Sejak limapuluh tahun yang lalu, pemahaman tentang karsinogenesis semakin berkembang dengan penggunaan hewan coba yang diinduksi dengan sinar ultraviolet, karsinogen kimiawi maupun virus tumor. Dengan memakai model hewan untuk mempelajari penyakit-penyakit pada manusia terutama lesi-lesi oral premaligna dapat berfungsi sebagai suatu model eksperimen yang lebih

terkontrol terutama dalam mempelajari patogenesis lesi-lesi tersebut.¹

Transformasi yang bersifat neoplastik merupakan suatu rangkaian tahap-tahap yang multipel yang akhirnya mekanisme genetik harus bertanggung jawab dengan adanya proliferasi yang abnormal sementara mekanisme untuk menekan proliferasi mengalami gangguan.² Dengan kata lain transformasi ini merupakan proses yang mengaktifasi onkogen namun di sisi lain gen onko-supresor diinaktifasi.

Penelitian epidemiologis pada manusia membuktikan bahwa karsinogen kimiawi merupakan penyebab utama terjadinya karsinoma sel skuamosa mukosa pada daerah kepala dan leher.³ Menurut konsep karsinogenesis eksperimental, diasumsikan bahwa karsinogenesis merupakan suatu proses panjang yang terdiri fase-fase inisiasi, promosi dan progresi.⁴ Demikian juga hal ini berlaku untuk karsinogenesis mukosa oral yang diinduksi dengan karsinogen kimiawi.

Pada penelitian ini akan dibuat model karsinoma rongga mulut pada tikus Sprague Dawley yang diinduksi dengan karsinogen kimiawi yang disebut 4 nitroquinoline 1-oxide (4NQO). Karsinogen kimiawi ini mampu menginduksi terjadinya kanker oral dengan histopatogenesis yang mirip dengan histopatogenesis yang terjadi pada manusia, begitu pula dengan perubahan imunologik yang terjadi. Sehingga dapat dikatakan bahwa penelitian karsinogenesis mukosa oral dengan menggunakan mukosa rongga oral rodent yang diaplikasi dengan 4NQO merupakan cara yang tepat untuk menyerupai lesi malignansi mukosa mulut yang terjadi pada manusia.⁵

Selama ini 4NQO telah banyak dibuktikan mampu menginduksi kanker oral melalui pemeriksaan histologis, yaitu dengan mengoleskan 4NQO 5% tiga kali seminggu pada mukosa oral tikus atau mencit untuk kurun waktu tertentu atau dengan melarutkan 4NQO dalam air minum hewan coba.^{6,7,8,9} Efek mutagenik 4NQO telah pula dibuktikan secara molekuler pada rodent yang telah diinduksi 4NQO yaitu dengan ditemukannya ada mutasi noktah pada kodon 12 dan kodon 61 dari gen H-ras.^{10,11} 4NQO termasuk karsinogen kimiawi yang bersifat baik sebagai inisiator maupun promotor. Untuk dapat berikatan dengan DNA, 4NQO memerlukan aktivasi metabolik dahulu agar dapat menjadi *ultimate carcinogen*, sehingga bahan ini diklasifikasikan sebagai karsinogen indirek.¹² Interaksi 4NQO dengan DNA melalui bentuk 4 hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO) yang bersifat reaktan elektrofilik kuat.¹³ Interaksi ini dikatalisis oleh seryl-tRNA synthetase dan membentuk *carcinogen-DNA adducts*.¹⁴

Ternyata mulut bukanlah merupakan satu-satunya organ target untuk 4NQO. Beberapa organ seperti kelenjar ludah, esofagus, lambung, hati, paru dan kulit diduga juga menjadi organ target dari 4NQO.¹⁵ Sehingga tidak menutup kemungkinan bahwa induksi 4NQO melalui mukosa rongga mulut akan berakibat pada organ-organ target lainnya. Hal ini kiranya sesuai dengan kenyataan yang sering ditemukan dalam bidang Ilmu Penyakit Mulut

bahwa keadaan yang terjadi di dalam rongga mulut sering merupakan manifestasi dari keadaan sistemik seseorang, demikian pula sebaliknya semua kejadian di mulut mempunyai kemungkinan untuk berdampak pada organ lain, terutama yang masih termasuk dalam rangkaian saluran pencernaan seperti esofagus, lambung dan usus. Oleh karena itu menjadi menarik untuk melihat perubahan-perubahan yang terjadi pada salah satu saluran pencernaan di atas, dalam hal ini esofagus sebagai saluran pencernaan pertama yang akan dicapai setelah melalui mulut perlu untuk diteliti perubahannya. Esofagus merupakan tabung otot yang berfungsi menyalurkan makanan dari mulut menuju lambung. Organ ini sangat penting dalam proses pencernaan, sehingga jika terjadi perubahan yang bersifat keganasan pada esofagus maka akan mengganggu masuknya makanan ke dalam saluran pencernaan selanjutnya. Pada akhirnya juga akan mengganggu pertumbuhan dan perkembangan tubuh karena kurangnya asupan nutrisi yang pada gilirannya menyebabkan daya tahan tubuh menjadi menurun. Sehingga tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh induksi 4NQO secara oral terhadap gambaran histopatologis esofagus tikus Sprague Dawley. Diharapkan hasil penelitian ini akan memberi kewaspadaan bahwa setiap perlakuan pada rongga mulut kemungkinan akan berdampak pada organ-organ atau saluran pencernaan lainnya.

Bahan dan Cara Kerja

Tikus Sprague Dawley jantan keturunan ke-57 (F₅₇) berumur 3 minggu sebanyak 16 ekor dengan berat badan (BB) 40 – 70 gram (PPOM, Jakarta) dipakai dalam penelitian ini setelah diaklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Farnakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi UGM. Larutan 4NQO 0,5% dibuat dengan melarutkan 0,5 gram serbuk 4NQO (Sigma Chemical Co., Australia) dalam Propane 1,2-diol (Sigma Aldrich Chemie. GmbH, Germany) sebanyak 100 ml. Tikus diberi pakan berupa pellet AD-2 (PT Japfa Comfeed Indonesia Tbk., Sidoarjo, Jawa Timur) dan air minum *ad libitum* dari air kran.

Ke-16 tikus dibagi menjadi 4 kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol (tanpa perlakuan) : 4 ekor, kelompok eksperimental -1 yang diaplikasi dengan 4NQO selama 8 minggu : 3 ekor, kelompok eksperimental - 2 yang diaplikasi dengan 4NQO selama 16 minggu : 4 ekor, kelompok eksperimental - 3 yang diaplikasi dengan 4NQO selama 24 minggu

5 ekor. Jumlah tikus yang tidak sama untuk setiap kelompok penelitian ini dengan alasan keterbatasan jumlah tikus yang ada sehingga jumlah yang lebih banyak diberikan pada kelompok yang diperkirakan mengalami perlakuan yang lebih berat.

Selama masa percobaan semua tikus eksperimental diaplikasi dengan 4NQO pada mukosa dorsal lidah menggunakan kuas gambar no.2 dengan satu kali usapan setiap kali aplikasi. Aplikasi dilakukan sebanyak tiga kali seminggu selama kurun waktu yang telah ditentukan. Setelah aplikasi mencapai durasi yang telah ditentukan, tikus dibiarkan hingga waktu nekropsi tiba yaitu pada akhir minggu ke 36. Selama masa penelitian kondisi kesehatan tikus dimonitor secara rutin, BB tikus ditimbang tiap dua minggu sekali. Bila kondisi tikus memburuk dan diperkirakan tidak dapat bertahan hingga akhir masa penelitian, maka tikus yang bersangkutan akan segera dinekropsi dengan anestesi ether. Pemeliharaan tikus selama masa penelitian dikondisikan dalam keadaan sama baik dari intake nutrisi, air minum, kandang dan kondisi ruangan. Untuk kelompok kontrol dibiarkan tanpa perlakuan hingga akhir minggu ke-36.

Pada akhir masa penelitian semua tikus dinekropsi yang terlebih dahulu dianestesi dengan ether, kemudian dilakukan dekapitasi. Selanjutnya organ lidah dan esofagus dieksisi untuk difiksasi dalam buffered formalin (BF) 10% selama 24 jam. Spesimen kemudian diproses untuk pembuatan blok paraffin kemudian dilakukan pengecatan Hematoksin dan Eosin (H&E).¹⁶

Preparat H&E diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100X, 200X dan 400X untuk dievaluasi perubahan histopatologis yang terjadi. Hasil pemeriksaan histopatologis diperbandingkan antara kelompok kontrol dan eksperimental untuk dianalisis secara deskriptif. Perubahan BB tikus dianalisis dengan ANAVA satu jalur.

Hasil

Dari hasil penimbangan BB tiap dua minggu sekali ada perbedaan yang nyata ($p=0.033$) rata-rata penambahan BB antara tikus kelompok kontrol (372 ± 39 gram) dan tikus kelompok eksperimental yang diolesi 4NQO selama 24 minggu (230 ± 77 gram). Semakin lama tikus diaplikasi 4NQO tampak kondisinya semakin melemah, dengan posisi badan cenderung untuk membungkuk dan aktivitas yang menurun. Bulu tikus eksperimental - 3 tampak lebih kusam dan kecoklatan dengan daerah sekitar

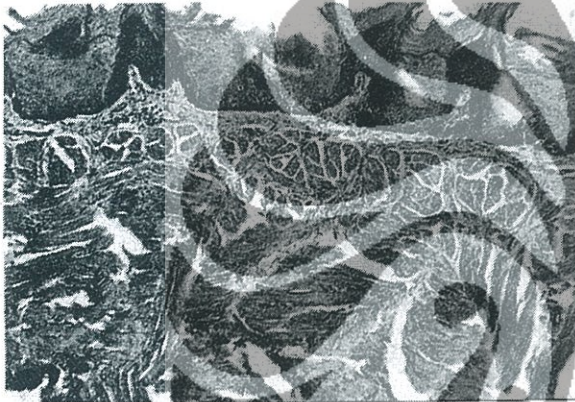
moncong tikus tampak lebih memerah dan selalu lembab. Sedang kondisi umum tikus kelompok kontrol tampak sehat, gerakan tikus tampak aktif, bulu yang lebat putih dan relatif mengkilat dengan BB tikus yang semakin bertambah.

Seekor tikus kelompok kontrol ditemukan telah mati pada minggu ke 25 dengan organ dalam yang sudah tidak ada. Ada dua ekor tikus dari kelompok eksperimental -3 yang diketemukan telah mati pada minggu ke 24 dan ke 31, bahkan satu dari tikus tersebut telah pula kehilangan matanya. Kedua tikus yang mati ini tampak mempunyai massa tumor pada permukaan dorsal lidahnya. Massa tersebut cukup besar, berwarna krem dan permukaannya agak porus.

Dari pengamatan makroskopis maupun mikroskopis pada lidah, tampak kelompok kontrol menunjukkan gambaran normal. Secara histologis tidak terjadi hiperkeratosis yang berlebihan maupun tanda-tanda hiperplasia. Lapisan epitel tampak teratur dari yang teratas lapisan keratin kemudian granulosum, spinosum dan basal. Adanya lamina propria yang mayoritas terdiri jaringan ikat disusul otot-otot lidah di bawahnya (Gambar 1). Secara makroskopis, lidah tikus kelompok eksperimental menunjukkan gambaran bervariasi antara penebalan warna putih pada permukaan dorsal lidah, massa tumor berwarna krem, atau penebalan putih berbentuk noduler. Hasil diagnosa histologis lidah tikus kelompok eksperimental semua didiagnosa sebagai Karsinoma Sel Skuamosa (KSS). Tampak banyak terbentuk *keratin pearls*, adanya banyak *tumor nest* di lamina propria (Gambar 2). Dengan perbesaran yang lebih besar akan tampak pula derajat mitosis yang tinggi disertai *bizarre mitosis*, adanya anisositosis maupun anisonukleosis serta gambaran sel dan nukleus yang polimorfik. Demikian juga teridentifikasi hilangnya kontak antar sel dan nukleus hiperkromatik yang sangat jelas, begitu pula tampak gambaran *drop shape rete ridge* dan stratifikasi epitel yang tidak teratur.

Dari pemeriksaan makroskopis pada organ esofagus tidak ditemukan adanya perubahan. Hasil penelitian gambaran histologik esofagus tikus secara umum menunjukkan adanya lapisan-lapisan yang terdiri atas tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa. Dari lapisan tersebut, yang terlihat mengalami perubahan adalah tunika mukosa. Pada pemeriksaan mikroskopis esofagus tikus kelompok kontrol semuanya (100%) terlihat tidak ada perubahan yang spesifik (Gambar 3). Gambaran mikroskopis esofagus tikus kelompok eksperimental-1 untuk semua tikus (100%) juga masih belum tampak adanya perubahan (Gambar 4).

Dari hasil pengamatan mikroskopis pada tikus kelompok eksperimental-2, tiga dari keempat tikus terlihat adanya gambaran hiperkeratosis (Gambar 5). Sedang seekor tikus yang lain tidak menunjukkan adanya perubahan. Hasil pengamatan mikroskopis tikus kelompok eksperimental-3, menunjukkan empat dari ke lima tikus terlihat adanya hiperkeratosis, nekrosis sel, dan proliferasi sel-sel epitel ke arah bawah pada tunika mukosa, dan ditemukan adanya gambaran mitosis (Gambar 6, 7, 8). Seekor tikus yang lain hanya menunjukkan hiperkeratosis. Hiperkeratosis yang terjadi pada kelompok eksperimental-3 lebih berat dari hiperkeratosis yang terjadi pada kelompok eksperimental-2.



Gambar 1 . Fotomikrograf lidah tikus kelompok kontrol (tanpa perlakuan). Lapisan epitel tampak teratur, adanya lamina propria yang mayoritas terdiri jaringan ikat disusul otot-otot lidah di bawahnya (H&E, 100 X)



Gambar 2. Fotomikrograf lidah tikus kelompok eksperimental yang diinduksi 4NQO selama 8, 16

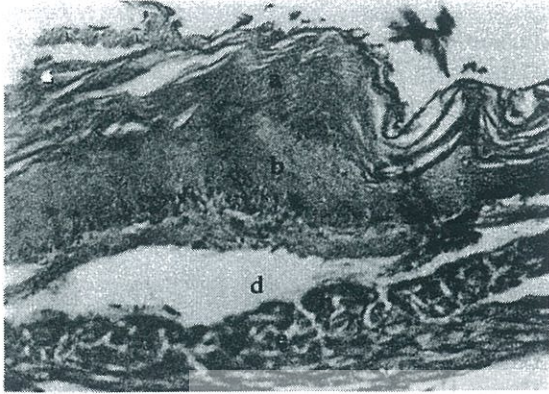
atau 24 minggu. Tampak banyak terbentuk *keratin pearls*, adanya banyak *tumor nest* di lamina propria (H&E, 200X)



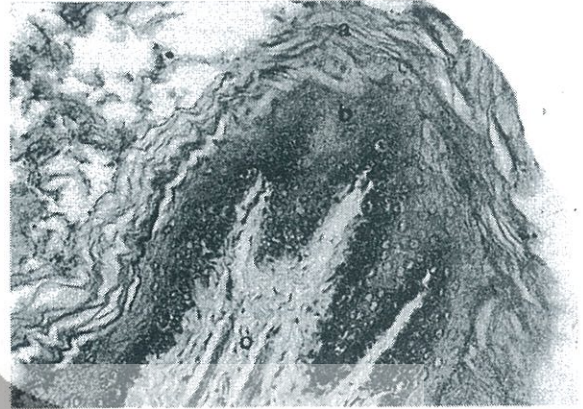
Gambar 3. Fotomikrograf esofagus tikus kontrol : (a) Keratin (b) Sel-sel epitel mukosa tampak tidak terjadi perubahan (c) Tunika muskularis mukosa (d) Tunika submukosa (e) Tunika muskularis (H&E, 200X)



Gambar 4. Fotomikrograf esofagus tikus kelompok eksperimental-1 yang diinduksi 4NQO selama 8 minggu: (a) Keratin (b) Sel-sel epitel mukosa tampak normal (c) Tunika muskularis mukosa (d) Tunika submukosa (e) Tunika muskularis (H&E, 200 X)



Gambar 5. Fotomikrograf esofagus tikus kelompok eksperimental - 2 yang diinduksi 4NQO selama 16 minggu : (a) Keratin mengalami hiperkeratosis (b) Sel-sel epitel mukosa tidak ada perubahan (c) Tunika muskularis mukosa (d) Tunika submukosa (e) Tunika muskularis (H&E, 200X)



Gambar 7. Fotomikrograf esofagus tikus kelompok eksperimental -3 yang diinduksi 4NQO selama 24 minggu : (a) Keratin mengalami hiperkeratosis (b) Sel-sel epitel mukosa mengalami proliferasi ke arah bawah (c) Tunika submukosa (H&E, 200 X)



Gambar 6. Fotomikrograf esofagus tikus kelompok eksperimental - 3 yang diinduksi 4NQO selama 24 minggu : (a) Keratin mengalami hiperkeratosis (b) Sel-sel epitel mukosa mengalami proliferasi ke arah bawah (c) Nekrosis sel epitel mukosa, ditandai dengan inti sel lisis dan sitoplasma asidofilik (H&E, 200X)



Gambar 8. Fotomikrografi esofagus tikus kelompok eksperimental - 3 yang diinduksi 4NQO selama 24 minggu : (a) Sel-sel epitel mukosa mengalami proliferasi ke arah tunika submukosa (b) Tunika submukosa (c) Sel epitel mukosa yang mengalami mitosis (H & E, 400X)

Pembahasan

Seekor tikus kelompok kontrol ditemukan telah mati pada minggu ke 25 diduga karena dimangsa oleh tikus lainnya. Kemungkinan karena tikus berebut makanan atau kondisi kandang yang kurang nyaman membuat salah satu tikus menjadi korban. Karena memang sesungguhnya tikus merupakan hewan kanibal. Dua ekor tikus dari kelompok

eksperimental -3 yang ditemukan telah mati pada minggu ke 24 dan ke 31 karena daya tahan tubuhnya yang semakin melemah berhubung kekurangan asupan gizi karena kesulitan makan dengan adanya massa tumor yang besar pada permukaan dorsal lidahnya.

Dari hasil di atas tampak bahwa induksi kanker lidah terutama KSS telah cukup berhasil dilakukan, namun di sisi lain organ pencernaan lain yang paling dekat dengan mulut yaitu esofagus juga mengalami perubahan ke arah malignansi (karsinoma). Hal ini

cukup beralasan karena bahan karsinogen tersebut akan tertelan dan akan melalui semua organ pencernaan berikutnya. Kemungkinan peluang bahan tersebut untuk berakumulasi dan menempel pada epitel organ-organ pencernaan tersebut adalah cukup besar karena perlakuan dengan 4NQO relatif cukup lama terutama untuk kelompok eksperimental-2 dan 3. Sehingga tidak menutup kemungkinan tahap-tahap karsinogenesis dapat dilalui dengan sempurna apalagi 4NQO selain bertindak sebagai inisiator juga berperan sebagai promotor (Miller dan Miller 1981). Semakin lama aplikasi 4NQO pada lidah maka perubahan ke arah keganasan bagi epitel organ-organ pencernaan tersebut akan semakin jelas.

Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan adanya hiperkeratosis esofagus dengan berbagai tingkat *atypia epithel* pada 40% tikus yang diaplikasi mukosa oralnya dengan 4NQO selama 8 minggu, sedang pada tikus yang diinduksi senyawa 4NQO selama 16 minggu ditemukan sekitar 20% karsinoma sel skuamus pada esofagus.⁷ Di sisi lain juga ditunjukkan bahwa senyawa 4NQO dalam larutan etanol yang diberikan pada esofagus secara infusi atau melalui minuman, menyebabkan banyak papiloma dan sedikit karsinoma sel skuamus. Pemeriksaan secara mikroskopis, terlihat adanya daerah penebalan pada mukosa esofagus akibat proliferasi sel epitel kompleks disertai dengan hiperkeratosis.¹⁷

Hasil yang didapat dari pengamatan mikroskopis pada kelompok tikus yang diinduksi 4NQO secara oral selama 8 minggu masih sama dengan kontrol, belum terjadi perubahan. Hiperkeratosis mulai terlihat pada tikus yang diinduksi 4NQO selama 16 minggu dan pada tikus yang diinduksi 4NQO secara oral selama 24 minggu ditemukan karsinoma sel skuamus pada esofagus.

Penyebab bervariasinya waktu munculnya tumor dari hasil penelitian ini dan penelitian sebelumnya antara lain : kondisi laboratorium yang berbeda; metode yang dilakukan pada penelitian ini yaitu senyawa 4NQO dioleskan pada permukaan dorsal lidah, tidak diberikan melalui air minum dan dosis yang digunakan juga berbeda dengan dosis pada penelitian sebelumnya. Faktor lain yang mungkin menyebabkan perbedaan waktu munculnya tumor dalam penelitian ini adalah faktor pakan. Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa pelet merupakan pakan rutin yang dipakai untuk hewan penelitian pada umumnya, bukan merupakan pakan khusus hewan untuk penelitian kanker.

AD-2 pelet merupakan pakan ayam yang mengandung flavonoid atau isoflavon yang berasal dari jagung, kedelai, dan lain-lain. Kedelai dan produk yang berasal dari kedelai telah diteliti merupakan sumber isoflavon.¹⁸ Flavonoid mempunyai peranan penting dalam memproteksi agen-agen toksik terutama pada kejadian keracunan yang bersifat akut.¹⁹ *Genistein* adalah derivat isoflavon yang sekeluarga dengan *coumarin* memperlihatkan potensi yang signifikan sebagai agen antikanker.²⁰ Berdasarkan referensi di atas memperkuat dugaan bahwa faktor pakan juga merupakan penyebab perbedaan waktu munculnya kanker dari hasil penelitian ini dengan penelitian sebelumnya.

Meskipun kontak langsung bahan karsinogen 4NQO adalah dengan permukaan dorsal lidah, namun kejadian perubahan ke arah malignansi (karsinoma) juga terjadi pada esofagus karena organ ini adalah salah satu organ target dari 4NQO, selain lambung, hati, paru, mukosa oral, kelenjar ludah dan kulit.¹⁵ Dari hasil penelitian tampak bahwa semakin lama waktu pemberian senyawa 4NQO secara lokal pada permukaan dorsal lidah tikus maka terjadinya proliferasi sel epitel yang disertai dengan hiperkeratosis juga semakin progresif. Hal ini mengindikasikan bahwa tahap karsinogenesis yang dicapai telah melewati fase promosi. Secara klinis perubahan ini akan bermanifestasi sebagai gangguan fungsi esofagus. Bagian saluran pencernaan ini merupakan tabung otot yang berfungsi menyalurkan makanan dari mulut ke lambung.²¹ Penebalan pada mukosa esofagus yang semakin meningkat dapat menyebabkan menyempitnya lumen esofagus, sehingga makanan akan sulit untuk masuk ke dalam saluran pencernaan berikutnya yang pada akhirnya dapat menyebabkan gangguan asupan gizi pada hewan coba.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pembuatan model karsinogenesis oral dengan 4NQO akan menginduksi perubahan yang bersifat malignansi di esofagus yang merupakan organ pencernaan yang paling dekat dengan mulut, meskipun tingkat keganasannya lebih ringan dibandingkan keganasan yang terjadi pada tempat aplikasi karsinogen yaitu permukaan dorsal lidah.

Daftar Pustaka

1. Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis : A review. *J Oral Pathol* 1981; 10: 129 - 46.
2. Merrit WD, Weissler MC, Turk BF dan Gilmer TM. Oncogene amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 1990; 116:1394 -8.
3. Rumsby G, Carcter RL dan Gusterson BA. Low incidence of ras oncogene activation in human squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 1990; 6:365-8.
4. Becker FF. Recent concept of initiation and promotion in carcinogenesis. *AJP*, 1981;105: 3-9.
5. Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH dan Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int. J Oral Maxillofac Surg* 1995;24:53-8.
6. Wallenius K dan Lekholm U. Oral cancer in rat induced by water-soluble carcinogen 4NQO. *Odont. Revy.*, 1973 ; 24 : 39 - 48.
7. Steidler NE dan Reade PC. Experimental Induction of Oral Squamous Cell Carcinomas in Mice with 4-nitroquinoline 1-oxide. *J. Oral Surg* 1984 ; 57 : 524 - 531.
8. Prime SS, Malamos D, Rosser T dan Scully C. Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide. *J Oral Pathol* 1986 ; 15 : 280 - 283.
9. Rich AM dan Reade PC. Histomorphometric Analysis of Epithelial Changes in Chemically Induced Oral Mucosal Carcinogenesis in Rats. *J Oral Pathol* 1988 17:525-33.
10. Yuan B, Heniford BW, Ackermann DM, Hawkins BL dan Hender FJ. Harvey *ras* (H-*ras*) point mutations are induced by 4NQO in murine oral squamous epithelia, while squamous cell carcinomas and loss of heterozygosity occur without additional exposure. *Cancer Res* 1994;54:5310-7.
11. Suzui M, Yoshimi N, Tanaka T dan Mori H. Infrequent Ha-*ras* mutations and absence of Ki-*ras*, N-*ras* and p53 mutations in 4NQO-induced rat oral lesions. *Mol Carcinog* 1995;14(4):294-8.
12. Miller EC dan Miller JA. Mechanisms of Chemical Carcinogenesis. *J Cancer* 1981;47: 055-64.
13. Sugimura T, Okabe K dan Nagao M. The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen : III. An enzyme catalyzing the conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rat liver and hepatomas. *Cancer Res* 1966; 26:1717-21.
14. Tada M dan Tada M. Seryl t-RNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature*, 1975; 255:510-2.
15. Ito N. *In Vivo Carcinogenesis of 4-nitroquinoline 1-oxide and Related Compound*, In: Sugimura, T. Ed. *The Nitroquinoline*. Raven Press. New York 1981: 149.
16. Drury RAB dan Wallington EA. *Carletons Histological Technique*. Oxford University Press. New York ; 1967:102- 13.
17. Sugimura T. *The Nitroquinolines*. Raven Press. New York 1981:128-9.
18. Atkinson C dan Bingham SA. Mammographic Breast Density as a Biomarker of Effects of Isoflavones on The Female Breast. *Breast Cancer* 2001;4: 1-4.
19. Claus EP. *Pharmacognosy*. Great Portland Street W I. London 1961: 134.
20. Davidson MW. Genistein, *J Carcinogenesis* 2004;3:404-7.
21. Dellmann HD dan Brown EM. *Buku Teks Histologi Veteriner II*. Judul Asli. Textbook of Veterinary Histology. Diterjemahkan R. Hartono. Edisi ketiga. UI Press. Jakarta 1992: 349-53.