

AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) PADA SEL PARU TIKUS YANG DIINDUKSI 7,12-DIMETILBENZ-[a]ANTRASENA (DMBA)

Wulan Puji Rahayu^{1,2}, Anisyah Achmad¹, Heny Ekowati^{1,2*}

1. Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Karangwangkal, Purwokerto 53123, Indonesia
2. Center of Excellence for Translational Research in Oncology (CENTRO), Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Karangwangkal, Purwokerto 53123, Indonesia

*E-mail: heny240377@gmail.com

Abstrak

Kanker paru merupakan penyebab kematian utama di dunia. *Nigella sativa* merupakan salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kloroform *N. sativa* memiliki efek sitotoksik pada sel T47D. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antiproliferasi ekstrak kloroform biji *N. sativa* pada hewan uji yang diinduksi DMBA. Tikus betina galur Sprague Dawley dibagi menjadi lima kelompok. Masing-masing kelompok terdiri atas 12 ekor. Kelompok A adalah kontrol DMBA, kelompok B, C, dan D, adalah kelompok perlakuan ekstrak dengan peringkat dosis 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 750 mg/kgBB, dan kelompok E adalah kelompok kontrol minyak jagung. Aktivitas proliferasi sel diamati dengan pengecatan AgNOR dan pengamatan histopatologi sel menggunakan pengecatan H & E. Nilai mAgNOR dianalisis menggunakan uji kolmogorov-dilanjutkan uji satu arah (*one way*) ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% yang diteruskan dengan uji Tukey HSD. Hasil pewarnaan H&E menunjukkan terdapat penurunan kerusakan pada kelompok perlakuan ekstrak dibanding dengan kelompok DMBA. Hasil pewarnaan AgNOR menunjukkan terjadi penurunan. Nilai mAgNOR kelompok kontrol DMBA adalah $1,47 \pm 0,558$, kelompok perlakuan ekstrak dengan tiga peringkat dosis masing-masing adalah $1,44 \pm 0,172$ untuk dosis 250 mg/kgBB, $1,38 \pm 0,140$ untuk dosis 500 mg/kgBB dan $1,25 \pm 0,164$ untuk dosis 750 mg/kgBB dan kelompok kontrol minyak jagung adalah sebesar $0,65 \pm 0,050$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *N. sativa* mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada kanker paru.

Abstract

Antiproliferative Activity of Black Seed (*Nigella sativa*) on 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA) Induced Mice Lung Cell. Lung cancer is the leading cause of death in the world. *Nigella sativa* is a plant that has an anticancer activity. Previous research showed that the chloroform extract of *N. sativa* have cytotoxic effect on T47D cells. This study aimed to observe the effect of chloroform extract of *N. sativa* seed (NSS) on mice lung cell after initiation of 7,12-dimethylbenz [a] anthracene. Sprague Dawley strain female rats were divided into five groups. Each group consisted of 12 rats. The experiment consisted of five mice groups, corn oil as a solvent control group, the DMBA dose 20 mg/kgBW p.o. twice a week during five weeks, DMBA+NSS dose 250 mg/kgBW, DMBA+NSS dose 500 mg/kgBW, and DMBA+NSS dose 750 mg/kgBW. Extract which was dissolved into corn oil was administered daily by the oral route 1 week before and during the DMBA induction. At the end of the study, the experimental mice were sacrificed and colon organs were collected and then stained with Haematoxylin and Eosin (H&E) and AgNOR method. H&E staining showed there was a decrease damage in the treatment group compare with DMBA group. In AgNOR staining result showed mAgNOR value in DMBA group was 1.47 ± 0.558 , in extract group (250, 500 and 750mg/kgBB) was 0.44 ± 0.172 , 1.38 ± 0.140 and 1.25 ± 0.164 respectively and in corn oil group was 0.65 ± 0.050 . The results showed that *N. sativa* reduced the damage of colon cells and inhibit colon cell proliferation on mice induced DMBA. This study indicated that *N. sativa* can be developed into a chemopreventive agent for lung cancer.

Keywords: AgNOR, antiproliferation, DMBA, Lung cancer, Nigella sativa

Pendahuluan

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan di dunia. Kanker paru merupakan salah jenis kanker yang mempunyai tingkat insidensi yang tinggi di dunia. Di Indonesia, kanker paru menjadi penyebab kematian utama kaum pria dan merokok merupakan penyebab utama terjadinya kanker paru.¹

Usaha-usaha pencegahan atau pengobatan kanker semakin penting mengingat frekuensi kejadiannya yang cukup tinggi. Usaha pencarian dan pemanfaatan obat tradisional terus ditingkatkan. Salah satu obat tradisional yang secara empiris digunakan sebagai antikanker adalah *N. sativa*. Kandungan *N. sativa* yang berupa minyak adalah 95,5% asam-asam lemak. Komponen utama lemak-lemak ini adalah asam linoleat (55,6%), asam oleat (23,4%), dan asam palmitat (12,5%) yang kemungkinan besar mempunyai efek anti karsinogenesis.

Secara ilmiah telah dibuktikan bahwa *N. sativa* mempunyai aktivitas antikanker, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Telah dilakukan uji sitotoksik ekstrak petroleum eter dan kloroform terhadap sel MCF-7, sel HeLa, dan sel wiDr dengan nilai IC50 masing-masing 164 µg/ml, 161 µg/ml; 402 µg/ml, 267 µg/ml, dan 331 µg/ml, dan 280 µg/ml.²

Penelitian menggunakan hewan uji tikus menunjukkan bahwa *N. sativa* berpotensi sebagai antiproliferasi serta dapat menghambat proses metastasis pada sel kanker.³ Asam linoleat yang terkandung pada *N. sativa* mampu menghambat perkembangan sel kanker payudara MDA-MB-231.⁴

Mekanisme penghambatan ataupun penyembuhan kanker sangatlah kompleks. Akhir-akhir ini, telah banyak penelitian yang mengungkap mekanisme penghambatan terjadinya tumor ataupun penyembuhannya, salah satunya melalui mekanisme antiproliferasi. Dalam penelitian ini ingin diketahui potensi ekstrak kloroform biji *N. sativa* sebagai antiproliferasi pada kanker paru tikus yang diinduksi 7,12-dimetilbenz-(a)-antrasen (DMBA). Dengan pemberian ekstrak yang dilakukan sejak awal yaitu sebelum dan selama inisiasi, diharapkan dapat diketahui potensi kemopreventif biji *N. sativa* yang merupakan bahan alam yang berpotensi untuk dikembangkan.

Metode Penelitian

Bahan. Biji *N. sativa*, kloroform, akuabides, alkohol 70%, 7,12-dimetilbenz[a] antrasena (DMBA) (Sigma Chem., Steinherm) sebagai agen penginduksi kanker, hewan uji galur Sprague Dawley umur satu bulan dengan bobot badan 50-150 g yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada

Yogyakarta, minyak jagung (*corn oil*) sebagai pelarut DMBA dan pelarut ekstrak, buffer formalin 10% sebagai larutan fiksasi organ, parafin, pewarna sediaan histologik (Hematoksilin dan Eosin), serta perak nitrat (AgNO₃) sebagai pengecat AgNOR.

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

Tikus betina umur 1 bulan, dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Masing-masing kelompok terdiri atas 12 ekor tikus. Kelompok A merupakan kelompok kontrol positif, yang dibuat model kanker paru dengan pemberian DMBA dalam minyak jagung dengan dosis 20 mg/kgBB secara peroral sebanyak 10 kali, yaitu seminggu 2 kali selama 5 minggu pada umur 1,5 bulan. Kelompok B-D, yaitu kelompok perlakuan, diberi ekstrak kloroform biji *N. sativa* dengan peringkat dosis 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 750 mg/kgBB setiap hari selama 14 hari sebelum inisiasi dan selama inisiasi (pemberian DMBA). Dosis, frekuensi, dan cara pemberian DMBA sama dengan kelompok kontrol positif. Kelompok E merupakan kelompok kontrol negatif, yaitu tikus umur 1,5 bulan yang diberi minyak jagung. Minyak jagung diberikan 10 kali, seminggu 2 kali selama 5 minggu. Tikus kelompok kontrol positif dan negatif selama empat belas 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, dilakukan nekropsi. Setelah itu dilakukan pewarnaan H&E untuk melihat perubahan histopatologinya dan dilakukan pewarnaan AgNOR untuk mengetahui aktivitas proliferasinya. Organ ini difiksasi dengan larutan formalin 10% sebelum dilakukan pengeblokan dengan parafin.

Pewarnaan H & E untuk melihat perubahan histopatologi sel paru.

Setelah 16 minggu, semua hewan dikorbankan kemudian organ paru diambil dan difiksasi dengan buffer formalin 10%. Setelah 12-24 jam fiksasi, 3-5 mm irisan jaringan ditanam dalam parafin, dan diwarnai dengan H&E kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

Pewarnaan AgNOR untuk melihat aktivitas proliferasi sel paru.

Irisan jaringan paru dari blok parafin setebal kurang lebih 3 µm diproses dengan xilen untuk menghilangkan lilinnya (deparafinisasi). Kemudian didehidrasi secara bertingkat dengan etanol selanjutnya dicuci dengan akuades. Langkah berikutnya, irisan ini ditutup dengan larutan pewarna AgNOR yang terdiri atas campuran satu bagian volume 2% gelatin dalam 1% larutan asam formiat dengan dua bagian volume 50% larutan perak nitrat, pada temperatur kamar di ruangan gelap selama kurang lebih 45 menit untuk mendapatkan hasil optimal. Sediaan kemudian dicuci dengan akuades dan didehidrasi dalam etanol dengan konsentrasi bertingkat dan ditutup dengan kaca penutup

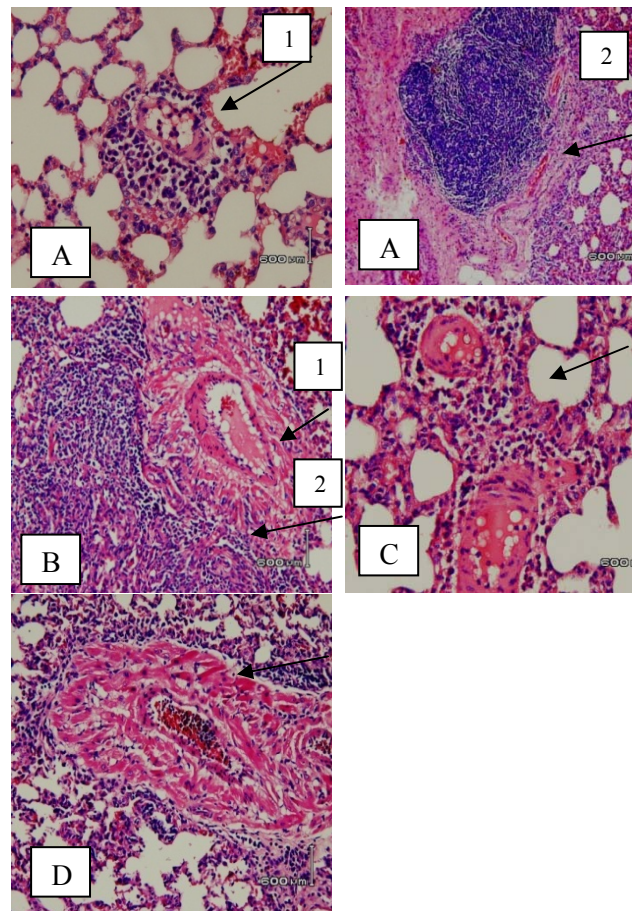
menggunakan medium sintetik. Jumlah AgNOR tiap sel dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X dalam minyak imersi. Pada tiap sampel dihitung minimal 100 sel dengan 5 kali pengamatan (5 daerah lapang pandang yang berbeda). Parameter aktivitas proliferasi menggunakan nilai mAgNOR yaitu rata-rata jumlah titik hitam (NOR) pada setiap sel, yang dilakukan dengan membagi semua jumlah titik hitam dalam sel yang teramati dengan semua jumlah sel yang teramati (minimal 100 sel). Pengecatan H&E dan AgNOR dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, UGM Yogyakarta, sedangkan pemeriksaannya dilakukan di Laboratorium Mikro Anatomi Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta di bawah mikroskop binokuler Olympus dengan perbesaran 1000X. Hasil direkam dengan kamera digital Canon S-40.

Analisis data. Data pengamatan mAgNOR dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji kolmogorov-smirnov untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak. Apabila data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji statistik kruskall walis. Jika data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan metode parametrik uji satu arah (*one way*) ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% yang diteruskan dengan uji Tukey HSD.

Hasil dan Pembahasan

***N. sativa* mampu mengurangi kerusakan sel paru tikus yang diinduksi DMBA.** Pembuatan model kanker paru pada penelitian ini menggunakan senyawa karsinogen 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA) dengan pertimbangan bahwa senyawa tersebut merupakan golongan polisiklik aromatik hidrokarbon yang paling poten.⁵ Berdasarkan penelitian terdahulu oleh Meiyanto,⁶ telah ditetapkan dosis serta frekuensi DMBA yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 20 mg/kgBB, dua kali seminggu selama 5 minggu. Selain itu disebutkan pula bahwa pemberian DMBA dengan dosis 20 mg/kgBB sebanyak 10 kali dalam 4 minggu telah dapat mengakibatkan perubahan secara mikroskopis. Pelarut yang digunakan adalah minyak jagung karena merupakan senyawa yang inert, dapat melarutkan DMBA dengan baik, dan tidak memiliki sifat karsinogenik.⁷ Pengamatan histopatologi sel paru dilakukan dengan pewarnaan H & E. Hematoxylin merupakan zat warna basa yang akan mewarnai jaringan basofilik (nukleoprotein dan mukopolisakarida asam) sehingga akan berwarna ungu atau biru, sedangkan eosin yang merupakan zat warna asam akan mewarnai komponen basa yang ada di dalam sitoplasma sehingga akan berwarna merah muda.

Peradangan yang terjadi adalah periarteritis yang kemungkinan merupakan awal terbentuknya kanker paru pada tikus akibat induksi DMBA. DMBA merupakan suatu zat karsinogen yang diaktivasi oleh



Gambar 1. Gambaran Histopatologi Sel Paru Tikus. (A) Kelompok kontrol DMBA, (B) Kelompok Dosis Ekstrak 250 mg/kgBB, (C) Dosis Ekstrak 500 mg/kgBB, (D) Dosis Ekstrak 750 mg/kgBB. Keterangan: (A1, B2,C) Periarteritis dengan Penebalan Alveoli karena Hiperemi Statis, Odema dan Infiltrasi Sel-Sel Limfositik. (A2) Peningkatan Nodus Limfatikus karena adanya Peradangan yang Mengakibatkan Ekspresi Nodus Limfatikus sebagai Mekanisme Pertahanan. (B1, D) Jaringan Ikat Meningkat

enzim sitokrom P450 untuk menjadi aktif menjadi senyawa epoksid yang bersifat reaktif untuk berikatan dengan DNA. Senyawa reaktif ini dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi membran lipid dan kerusakan pada sel. Hal ini terlihat pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kgBB yang mengalami kerusakan sel berupa periarteritis. Terjadinya peradangan dipertarai oleh adanya enzim siklooksigenase (COX). Enzim COX terdiri atas 2 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.⁸ COX-2 juga berperan dalam proliferasi sel kanker. Overekspresi COX-2 ditemukan pada kebanyakan kanker.⁹

Pada penelitian sebelumnya dilakukan fraksinasi ekstrak kloroform biji *N. sativa* kemudian senyawa yang terkandung pada ekstrak tersebut diidentifikasi dengan menggunakan GC-MS. Senyawa yang diperoleh dari fraksinasi adalah asam linoleat, asam palmitat, dan senyawa indol triptamin yang merupakan alkaloid.²

Peradangan yang terjadi pada sel paru tikus mampu dihambat oleh adanya ekstrak kloroform biji *N. sativa* pada dosis 750 mg/kgBB. Hal ini terlihat pada gambaran histopatologi antara kelompok kontrol DMBA dan kelompok dosis ekstrak 750 mg/kgBB. Sel paru pada kelompok kontrol DMBA mengalami periarteritis sedangkan pada kelompok dosis ekstrak 750 mg/kgBB sel paru tidak mengalami periarteritis. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Simopoulos,¹⁰ yang menyatakan bahwa asam linoleat (omega 3) dan asam linoleat α (omega 6) mampu mempengaruhi ekspresi gen pada hewan uji, memiliki aktivitas antiinflamasi, mampu menekan interleukin-1 β (IL-1 β), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), dan interleukin-6 (IL-6). Dengan demikian, asam linoleat yang terkandung dalam ekstrak kloroform biji *N. sativa* mampu mengurangi peradangan yang terjadi pada sel paru tikus.

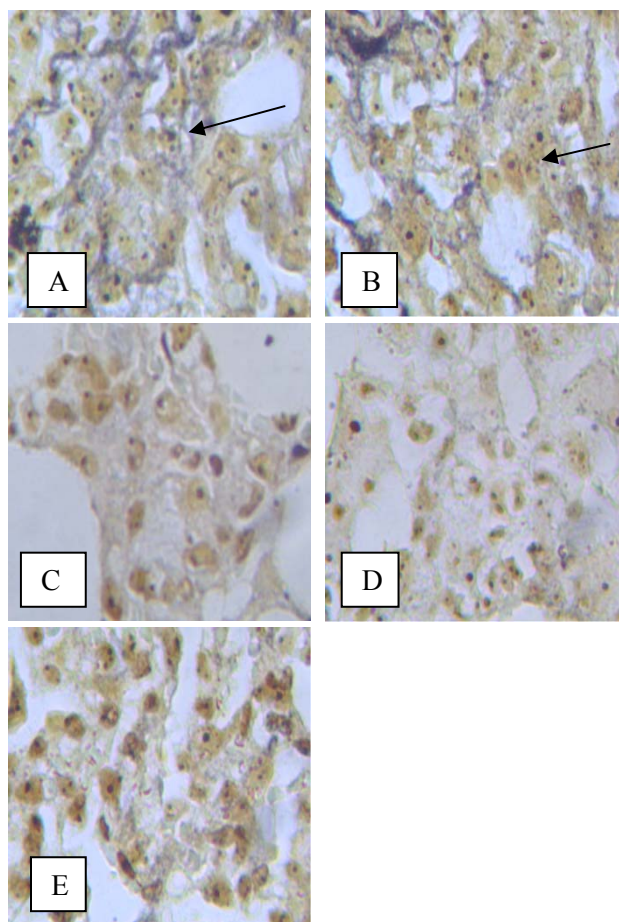
***N. sativa* mampu menurunkan aktivitas proliferasi sel paru tikus yang diinduksi DMBA.** Pemeriksaan aktivitas proliferasi sel paru dilakukan dengan metode AgNOR karena metode ini cepat, reproduibel, dan murah serta dapat dilakukan pada jaringan yang difiksasi secara konvensional. Hasil ikatan antara protein yang dihasilkan oleh kromosom 13 yang bersifat argirofilik dengan AgNO₃ dan menghasilkan titik-titik hitam (*blackdots*) yang menggambarkan aktivitas proliferasi dari suatu sel.¹¹ Penghitungan AgNOR sebagai penanda proliferasi bermanfaat untuk diagnosis sitopatologi pada beragam bentuk malignan, termasuk kanker paru.¹² Aktivitas proliferasi dihitung dengan menggunakan metode mAgNOR, yaitu dengan mengamati jumlah *blackdots* di tiap sel kemudian dihitung rata-rata *blackdots* di tiap 100 sel. Semakin tinggi tingkat proliferasi maka semakin banyak titik hitam yang teramati.¹³

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform *N. sativa* mampu mengurangi aktivitas proliferasi sel paru tikus yang diinduksi DMBA, dinyatakan dengan nilai mAgNOR (Tabel 1, Gambar 3). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform *N. sativa* memiliki potensi sebagai antiproliferatif karena mampu menurunkan aktivitas proliferasi sel-sel tumor paru tikus karena induksi DMBA. Efek antiproliferatif ini dapat mencegah progresi sel-sel kanker menjadi bentuk malignan (ganas).

Penghambatan proliferasi sel oleh ekstrak kloroform biji *N. sativa* dikarenakan adanya kandungan asam linoleat

yang tinggi. Asam linoleat yang terkandung dalam ekstrak kloroform *N. sativa* merupakan senyawa yang mampu mengurangi proliferasi pada sejumlah kultur sel.¹⁴ Asam linoleat mampu mengurangi proliferasi sel kanker pada kanker paru, payudara, prostat, dan kanker kolon.¹⁵

Beberapa penelitian menyatakan bahwa asam linoleat mampu menghambat pembentukan *DNA adduct* yang diinduksi oleh paparan karsinogen seperti DMBA, mampu mengaktifkan ekspresi gen yang terlibat dalam transkripsi dan transduksi sinyal, menginduksi aktivasi caspase dan apoptosis pada sel tumor, dan menghambat angiogenesis secara *in vivo* sehingga dapat menghambat proliferasi sel.¹⁶⁻¹⁷ Asam linoleat 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 *stress* tertentu pada sel.

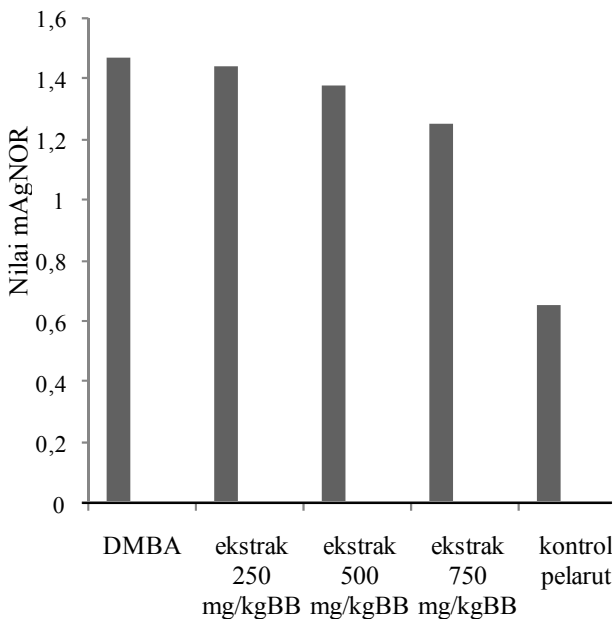


Gambar 2. Gambaran Histopatologi Hasil Pewarnaan AgNOR dari Sel Paru Tikus (A) Kelompok Kontrol DMBA (B) Kelompok Dosis Ekstrak 250 mg/kgBB (C) Kelompok Dosis Ekstrak 500 mg/kgBB (D) Kelompok Dosis Ekstrak 750 mg/kgBB (E) Kelompok Kontrol Pelarut Minyak Jagung. Keterangan : \rightarrow (*blackdots*).

Tabel 1. Nilai mAgNOR (Rata-rata±SD) Sel Paru Tikus

Kelompok	Tikus	Jumlah <i>blackdots</i>	Jumlah sel	Nilai mAgNOR	Rata-rata±SD
Kontrol DMBA	A1	120	102	1,18	1,47±0,558
	A2	113	111	1,13	
	A3	248	117	2,12	
Ekstrak 250 mg/kgBB	B1	168	127	1,32	1,44±0,172
	B2	155	133	1,37	
	B3	185	113	1,64	
Ekstrak 500 mg/kgBB	C1	148	100	1,48	1,38±0,140
	C2	144	100	1,44	
	C3	122	100	1,22	
Ekstrak 750 mg/kgBB	D1	121	100	1,21	1,25±0,164
	D2	111	100	1,11	
	D3	144	100	1,43	
Kontrol pelarut	E1	96	100	0,96	0,65±0,050
	E2	127	100	1,27	
	E3	102	100	1,02	

Keterangan: mAgNOR = *mean AgNOR score* (rata-rata±SD) pada sel paru tikus, secara statistik berbeda bermakna pada dosis ekstrak 750 mg/kgBB dengan kelompok DMBA ($p < 0.05$) dengan *one way Anova* dilanjutkan dengan *Tukey HSD*. (1) kontrol DMBA; (2) DMBA+250 mg/kgBB ekstrak; (3) DMBA+500 mg/kgBB ekstrak; (4) DMBA+750 mg/kgBB ekstrak; (5) minyak jagung. Proliferasi tertinggi terjadi pada kelompok DMBA 20 mg/kg dan kemudian menurun dan yang paling signifikan turun adalah pada kelompok ekstrak 750 mg/kg.



Gambar 3. Nilai mAgNOR sebagai Gambaran Aktivitas Proliferasi Sel Paru Tikus yang Diberi Ekstrak Kloroform Biji *N. sativa*

Protein ini memacu proses apoptosis melalui peningkatan protein Bax. Protein Bax akan diaktifkan oleh protein Bcl-xL yang kemudian akan mengaktifkan sitokrom c yang dilepas dari mitokondria dan selanjutnya akan terjadi aktivasi berantai terhadap caspase 9 dan caspase 3, sehingga terjadi apoptosis. Asam linoleat mampu menginduksi apoptosis dengan

cara *upregulasi* dari protein proapoptosis Bax dan *downregulasi* dari protein antiapoptosis Bcl-xL sehingga aktivitas proliferasi sel dapat dikurangi.¹⁸ Penekanan terhadap protein Bcl-xL disebabkan karena asam linoleat merupakan asam lemak yang mampu menyebabkan *downregulasi* sinyal ErbB3, Phosphoinositide3, dan jalur Akt yang dapat menekan ekspresi Bcl-xL.

Selain melalui mekanisme induksi apoptosis, asam linoleat mampu mengurangi proliferasi sel dengan mengurangi ekspresi cyclin A dan cyclin D. Kedua cyclin ini merupakan cyclin yang mengatur konversi dari fase G1 ke fase S pada siklus sel.¹⁹ Dengan penurunan ekspresi ini, dimungkinkan proliferasi sel dapat dihambat dan menyebabkan *cell cycle arrest*. Data tersebut menunjukkan bahwa asam linoleat mengurangi proliferasi sel dengan cara menghambat sintesis DNA dan menghambat protein-protein yang mengatur pada proses siklus sel.²⁰

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *N. sativa* mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada kanker paru.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Jenderal Soedirman melalui Program Penelitian Hibah Bersaing (Nomor Kontrak:1580.05 /H23.6/ DT.01.00/

2010) yang telah memberikan dukungan dana untuk penelitian ini.

Daftar Acuan

1. Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Oláh E, Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human Lung Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2001; 7(1):6-13.
2. Ekowati H, Rahmani EPN, Rastuti U. The active fraction from *Nigella sativa* and its activity against T47D cell line. *IJC.* 2011;11(3):217-22.
3. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2008;7(7):1789-96.
4. Hasanzadeh GK, Latiffah AL, Hanachi P, Hj Lajis N. Effect of linoleic acid of *Nigella sativa* on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Iran J Cancer Prev.* 2011;4(2):65-70.
5. King RJB. *Cancer Biology.* 2nd edition, School of Biological Sciences, University of Surrey, Pearson Education, Harlow-England-London-New York; 2005.
6. Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, Sugiyanto. Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *Majalah Farmasi Indonesia.* 2007;18(3):154-61.
7. Singletary K, Macdonald C, Wallig M. The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) inhibits 7,12-dimethyl benz (α) anthracene (DMBA)-induced rat Mammary DNA adduct formation and tumorigenesis, *Carcinogenesis.* 1997;18(8):1669-73.
8. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*, *Cancer Res.* 2002;62:625-31.
9. Simmons DL, Moore BC. COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Curr Med Chem.* 2000;7:1131-44.
10. Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17:131-4.
11. Irawan. 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, Semarang: Universitas Diponegoro; 2008.
12. Lee YC, Chern JH, Pan CC, Chang SC, Perng RP. Argyrophilic nucleolar organizer regions in cells of thymoma and thymic carcinoma "Correlation with DNA ploidy and clinicopathologic characteristic", *Chest.* 1999;115:1115-19.
13. Rizali E, Auerkari EI. Teknik pewarnaan silver (AgNOR) sebagai salah satu cara menentukan aktivitas proliferasi sel tumor dan apoptosis, *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia.* 2003;10(3):41-45.
14. Scimeca JA, *Cancer inhibition in animals.* In: Advances in conjugated linoleic acid research, Vol. 1 (Yurawecz MP, Mossobo MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ, eds.): 420443. Champaign, IL: AOCS Press; 1999.
15. Maggiora M, Bologna M, Ceru MP, Possati L, Angelucci A, Cimini A, Miglietta A, Bozzo F, Margiotta C, Muzio G, Canuto RA. An overview of the effect of linoleic and conjugated linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *J Int Cancer.* 2004;112:909-19.
16. Kritchevsky D. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Br J Nutr.* 2000;83:459-65.
17. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:505-31.
18. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones N, Whitehouse J, Corfe BBM *et al.* Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein bak *in vivo* precede the onset of apoptosis, *J Cell Biol.* 1999;144:903-914.
19. Ip C, Dong Y, Thompson HJ, Bauman DE, Ip MM. Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer.* 2001;39:233-38.
20. Futakuchi M, Cheng JL, Hirose M, Kimoto N, Cho YM, Iwata T, Kasai M, Tokudome S, Shirai T. Inhibition of conjugated fatty acids derived from saf flower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1 methyl phenylimidazo [4,5b] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.* 2002;178:131-9.