



Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik Biji Jinten Hitam (*Nigela sativa*) pada Terjadinya Kanker Kulit Mencit Strain Terinduksi Ultraviolet

*Chemopreventive Effect Ethanolic Extract of Black Cumin Seeds (*Nigela sativa*) on the Occurrence of Skin Cancer Mice Ultraviolet-Induced*

Sri Tasminatun¹, Sri Nabawiyati Nurul Makiyah²,
Ahmad Edy Purwoko¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Science, Muhammadiyah University of Yogyakarta

²Department of Histology & Cell Biology, Faculty of Medicine and Health Science, Muhammadiyah University of Yogyakarta

KATA KUNCI KEYWORDS

Efek kemopreventif; *N. sativa* ekstrak etanol; Kanker kulit
Chemopreventive effect; *N. sativa* ethanolic extract; Skin cancer

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *N. sativa* terhadap terjadinya kanker kulit mencit terinduksi sinar UV. Mencit galur Balb-C dicukur punggungnya hingga bersih. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok I-III diberi ekstrak etanolik biji *N. sativa* dengan dosis 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400mg/kgBB, kontrol positif yang diinduksi kanker dengan UV, kontrol negatif yang tidak mendapat perlakuan, dan kontrol negatif diberi CMC (sebagai pelarut ekstrak). Disimpulkan bahwa ekstrak etanolik biji *N. sativa* setelah pemaparan ultraviolet menurunkan insidensi kanker kulit mencit sebesar 5,3%-43,2%, menurunkan tumor multiplicity 45-55% tetapi secara statistik tidak signifikan, menunjukkan gambaran histopatologik kulit yang lebih baik, meningkatkan ekspresi p53 secara statistik berbeda signifikan.

ABSTRACT

The aims of this study is to determine the chemopreventive effect of ethanolic extract of *N. sativa* seeds in the mice skin cancer induced by UV rays. Mice of strain Balb-C were shaved their back until clean. The mice were divided into 6 groups: group I-III given ethanolic extract of *N. sativa* seed at a dose of 100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg and group IV as positive control of cancer induced by UV, group V as negative controls which did not receive the treatment, and group VI as CMC negative control (as an extract solvent). The ethanolic extract of *N. sativa* seeds can reduce the incidence of skin cancer in mice by

5.3%-43.2% after exposure to Ultraviolet, decrease tumor multiplicity by 45-55%, however it not statistically significant, showed better skin histopathological description, p53 expression was statistically significant.

Kanker merupakan penyakit seluler dengan ciri adanya sifat pertumbuhan yang tidak terkendali, diikuti dengan proses invasi ke jaringan dan penyebarannya (metastasis) ke bagian organ tubuh yang lain (King, 2000). Di Indonesia diperkirakan ada 170-190 kasus baru pada 100.000 penduduk setiap tahun (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002). Salah satu kanker yang insidensinya tinggi adalah kanker kulit. Dari semua jenis kanker, pada tahun 1988-1991, insidensi kanker kulit di Indonesia mencapai 7,69-8,64% pertahun. Pada laki-laki, insidensi kanker kulit menempati urutan pertama, disusul oleh kanker nasofaring. Sedangkan pada wanita insidensi kanker kulit menempati urutan keempat setelah kanker leher rahim, kanker payudara dan kanker limfonodi (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002).

Usaha penyembuhan sangat sulit karena kanker merupakan penyakit seluler dengan patofisiologi yang kompleks dan melibatkan proses mikroevolusioner. Bentuk perlakuan yang paling baik terhadap kanker adalah pencegahan. Pendekatan lain adalah deteksi dini. Semakin sedikit dan semakin jinak sel-sel kanker, maka semakin besar kemungkinan untuk dapat disembuhkan (King, 2000). Untuk itu perlu dilakukan usaha penemuan kemopreventif berupa senyawa yang dapat digunakan untuk menghambat, menunda, atau membalikkan proses terjadinya kanker (Surh, 2003).

Di Indonesia pengobatan tradisional dengan menggunakan tumbuh-tumbuhan sudah menjadi kebiasaan selama berpuluh-puluh tahun. Tetapi bukti ilmiah tentang efektifitas penyembuhannya belum lengkap. Dari bukti secara empirik, beberapa tumbuhan memang berpotensi sebagai obat kanker (Hutapea, 1994).

Penelitian mengenai khasiat *N. sativa* sebagai obat antikanker telah dilakukan oleh El-Kadi dan Kandil (1986). Kedua peneliti tersebut mengamati adanya peningkatan aktivitas *natural killer cells* sebesar 200-300% pada pasien kanker yang memperoleh program imunoterapi multimodal dengan *N. sativa* sebagai salah satu komponennya. Selain itu aktivitas anti kanker *N. sativa* telah diteliti secara *in vitro* pada *cancer cell lines* dan *in vivo* memakai hewan coba (Randhawa *et al.*, 2002). El Sayed and Fukushima (2003) mengkaji efek kemopreventif *volatil oil N. sativa* terhadap induksi dan per-kembangan *aberrant crypt foci* (ACF), suatu lesi putatif preneoplastik untuk kanker kolon terinduksi 1,2 dimetil-hidrazin. Burits dan Bucar (2000) me-laporkan bahwa *N. sativa* mempunyai efek antioksidan.

Correspondence:
Sri Nabawiyati Nurul Makiyah, S.Si., M.Kes,
Department of Histology & Cell Biology, Faculty of
Medicine and Health Science, Muhammadiyah University
of Yogyakarta, Jalan Pendidikan Sonopakis, Ngestihardjo,
Kasihah, Bantul, Yogyakarta

Tanaman *N. sativa* memiliki berbagai kandungan kimia. Bahan tersebut antara lain zat-zat lemak, protein, kalium, melantin (saponin), nigellin (zat pahit), nigelon, zat samak, dan timokinon (Anonim, 1985). Juga minyak atsiri yang komponen penyusunnya terdiri dari karvon, limonene, dihidrokarvon, dihidrokarveol, asetaldehid, furol, karvektol, pinen, felandren, simen, terpen-terpen (Mardisiswoyo dan Rajakmangunsudarso, 1985), serta timokuinolin dan ditimokuinon (Jones, 2000).

Apoptosis memiliki peran yang amat penting untuk menjaga homeostatis perkembangbiakan sel yaitu dengan membatasi proliferasi sel (Meiyanto, 1999). Pada kanker, mekanisme apoptosis ini hilang, karena mutasi pada gen *p53* (Hanahan and Weinberg, 2000). Gen *p53 tumor suppressor protein* akan meng-upregulasi ekspresi dari protein proapoptosis. Peningkatan ekspresi protein *p53* akan memacu terjadinya apoptosis, sehingga proliferasi sel dapat dihambat.

Perkembangan sel kanker selalu diikuti dengan proses angiogenesis yang memungkinkan sel mendapatkan pasokan nutrisi dan oksigen, sehingga dapat terus bertahan hidup (King, 2000). *Signal* inisiasi pada proses angiogenesis ini di antaranya adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Ekstrak biji *N. sativa* dilaporkan mempunyai efek antikanker dengan mekanisme sebagai antiangiogenik (Al Ghamdi *et al.*, 2001). Penghambatan ekspresi VEGF dan FGF akan mencegah proses angiogenesis (Hanahan and Weinberg, 2000). Jika proses angiogenesis tidak terjadi, maka perkembangan sel-sel kanker juga akan dihambat.

Data ilmiah tentang penggunaan ekstrak etanolik biji *N. sativa* sebagai agen kemopreventif secara *in vivo* masih terbatas. Untuk memperoleh informasi ilmiah ini, perlu dilakukan penelitian tentang efek kemopreventif ekstrak etanolik *N. sativa* terhadap terjadinya kanker kulit mencit terinduksi sinar ultra violet. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *N. sativa* terhadap terjadinya kanker kulit mencit terinduksi sinar UV. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pembuktian secara ilmiah mengenai penggunaan *N. sativa* sebagai antikanker terutama kanker kulit.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental murni. Variabel bebas adalah ekstrak etanolik biji *N. sativa*. Variabel tergantungan adalah insidensi kanker kulit, *tumor multiplicity*, gambaran histologik kanker kulit, dan ekspresi *p53*. Variabel terkendali adalah; a) subyek penelitian, yaitu mencit betina galur Balb-C berumur 12 minggu dengan berat ± 30 gram; b) faktor genetik menggunakan mencit satu galur yaitu galur Balb-C dan dilakukan randomisasi dalam menentukan sampel; c) kondisi kandang dan pakan yang sama.

Penelitian dilakukan terhadap mencit (*Mus musculus*) betina galur Balb-C berumur 8 minggu yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 3 kelompok perlakuan ekstrak, kelompok kontrol positif UV, kelompok kontrol negatif cmc masing-masing 15 ekor dan kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan sebanyak 5 ekor. Bahan-bahan untuk penelitian adalah biji *N. sativa*, formalin, pewarnaan

Hematoksilin & Eosin. Bahan-bahan untuk imunohistokimia adalah acetone, antibodi primer terhadap gen *p53*, fosfat buffer saline (PBS), avidin, biotin, antibodi IgG biotinisasi sekunder, konjugat avidin terhadap peroksidase "horseradish", kromogen DAB, akuades, dan hematoksilin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat maserasi, alat-alat gelas, kandang mencit, seperangkat alat induksi kanker dengan sinar UV, seperangkat alat bedah mencit, timbangan mencit, kaca pembesar, mikroskop, serta seperangkat alat pembuat preparat histologi.

Cara Penelitian

Pembuatan ekstrak

Ekstrak etanolik biji Jinten Hitam dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Uji kemopreventif

Persiapkan hewan uji

Hewan uji diadaptasikan selama 1 minggu sebelum penelitian. Punggung tikus dicukur hingga bersih. Hewan uji dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

- Kel 1: Kelompok Nigela I , yang diberi ekstrak etanolik biji *N. sativa* dengan dosis 100mg/kgBB
- Kel 2: Kelompok Nigela II , yang diberi ekstrak etanolik biji *N. sativa* dengan dosis 200mg/kgBB
- Kel 3: Kelompok Nigela III, yang diberi ekstrak etanolik biji *N. sativa* dengan dosis 400mg/kgBB
- Kel 4: Kontrol positif yang di-induksi kanker dengan UV
- Kel 5: Kontrol negatif yang tidak mendapat perlakuan

Kel 6: Kontrol negatif CMC (sebagai pelarut ekstrak)

Pemberian ekstrak etanolik biji *N. sativa*.

Ekstrak etanolik biji *N. sativa* dilarutkan dalam aquades yang mengandung CMC 0,5%. Sebanyak 0,1 ml larutan dioleskan pada kulit punggung mencit segera setelah pemaparan/inisiasi UV. Induksi kanker kulit. Pada kulit punggung mencit diberi paparan UV 4,68kJ/m², 3-5 kali seminggu hingga 85 kali, total dosis UV 397.8kJ/m² (modifikasi Budiyanoto, 2005) dan Widayarini, 2005).

Pengamatan insidensi dan tumor multiplicity.

Setelah inisiasi UV, diamati perubahan makroskopis kulit mencit. Gejala munculnya (Widayarini, 2015) kanker dicatat. Insidensi dan jumlah nodul tumor setiap mencit (*tumor multiplicity*) juga diamati. Pada akhir minggu ke-32, semua mencit dikorbankan. Kulit punggung mencit tempat perlakuan diisolasi, sebagian di simpan pada suhu -20°C dan sebagian lagi difiksasi dalam formalin 10%.

Pembuatan dan pengamatan preparat H&E.

Jaringan kulit yang sudah di fiksasi dalam formalin digunakan untuk pembuatan preparat dengan teknik pengecatan H&E. Preparat histologi diamati dengan mikroskop cahaya® di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UMY dengan perbesaran antara 200-400X. Preparat H&E dianalisis perubahan-perubahan yang terjadi pada tingkat seluler secara deskriptif untuk mengetahui perubahan dan tingkat keparahan kanker.

Pemeriksaan ekspresi p53.

Prosedur pemeriksaan ekspresi p53 dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS Dr. Sardjito Yogyakarta dengan prosedur sebagai berikut:

Jaringan kulit 'frozen section' diiris dan difiksasi dengan aseton.

Preparat direndam dalam metanol selama 5 menit, aseton selama 3-5 menit kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

Preparat direndam dalam 3% hidrogen peroksida (H_2O_2 dalam metanol) selama 20 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

Preparat diinkubasikan dalam *normal mouse serum* (1:50) selama 5 menit. Selanjutnya *normal mouse serum* dibuang (tanpa cuci), preparat ditetesi dengan antibodi primer (Primer Antibodi Monoklonal anti p53) dengan pengenceran 1:100 dan diinkubasi minimal selama 60 menit.

Dicuci dalam PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

Preparat diinkubasikan dengan biotin selama 10 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

Diinkubasi dalam *streptavidin-peroksidase* selama 10 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

Diinkubasi dalam DAB selama 3-8 menit.

Dicuci dengan air kran, lalu dengan akuades.

Direndam dalam hematoksilin selama 10 detik.

Dicuci dengan air kran.

Preparat ditetesi dengan *mounting fluid* dan ditutup *deckglass*.

Ekspresi p53 atau VEGF sel kanker kulit diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan p53 akan memberikan warna coklat atau gelap (positif), sedangkan yang tidak mengekspresikan memberikan warna ungu (negatif). Pengamatan dilakukan secara kuantitatif, dengan menghitung prosentase sel yang positif.

Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan metode yang berbeda sesuai dengan jenis datanya. Data jumlah mencit yang mengandung kanker kulit (insidensi) dianalisa dengan metode survival analisis Kaplan Meier (Program GraphPad Prism ver 4), sedangkan *tumor multiplicity* antar kelompok dianalisis dengan uji statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan Man Whitney U Test.

Preparat histologi kulit diamati dengan mikroskop cahaya® dengan perbesaran 100x dan 400x dan dianalisis perubahan-perubahan yang terjadi pada tingkat seluler. Preparat H&E dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui perubahan dan tingkat keparahan kanker kulit.

HASIL

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *Nigela sativa* terhadap terjadinya kanker kulit mencit terinduksi sinar ultra violet (UV). Ekstrak diberikan segera setelah pemaparan sinar UV secara topikal sebanyak 0,1ml dengan tiga peringkat dosis yaitu 100mg/kgBB, 200mg/kgBB dan 400mg/kgBB. Tolok ukur efek kemopreventif dievaluasi berdasarkan persentase jumlah mencit yang positif kanker dalam satu kelompok

(insidensi), rata-rata jumlah nodul tumor pada setiap mencit (*tumour multiplicity*), gambaran histopatologi kulit mencit, serta ekspresi p53. Jumlah mencit yang positif tumor dinyatakan sebagai insidensi tumor yang disajikan dalam bentuk persentase dan jumlah nodul tumor pada setiap tikus disajikan dalam bentuk rerata \pm SD. Analisis histopatologik kulit mencit dilakukan dengan pengecatan HE. Pemeriksaan ekspresi protein p53 dilakukan dengan metode imunohistokimia.

Ekstrak etanolik Biji *Nigela sativa*

Identifikasi penting dilakukan untuk mengetahui bahwa bahan utama yang diteliti benar-benar biji *N sativa* serta menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Biji *N sativa* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi dari pasar Beringharjo yang dipanen dari daerah Kulon Progo Yogyakarta.

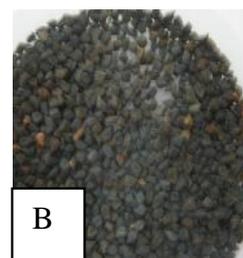
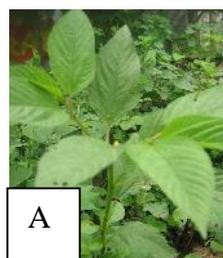
Ekstrak etanolik biji *Nigela sativa* dibuat dengan metode maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Metode maserasi dipilih, karena teknik ekstraksinya yang sederhana, dengan peralatan yang sederhana dan tanpa disertai pemanasan. Rendemen yang diperoleh pada proses ekstraksi sebesar 11,15%.

Uji efek kemopreventif ekstrak etanolik biji *Nigela sativa*

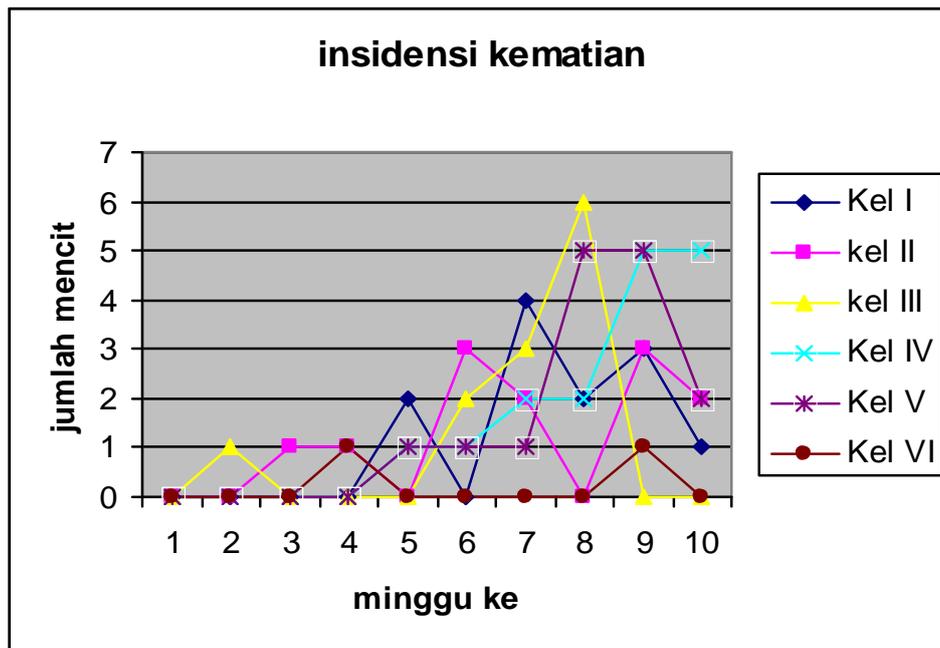
Karsinogenesis kanker kulit mencit dapat diinduksi oleh sinar UV

(SUV) melalui pembentukan berbagai senyawa *photoproducts* terutama cyclobutane pyrimidin dimer (CPD). Senyawa CPD terbentuk akibat pirimidin yang menyerap energi SUV akan tereksitasi dan berikatan dengan pirimidin disebelahnya melalui ikatan kovalen dua atom C berikatan ganda, menyebabkan 2 cincin pirimidin disatukan melalui pembentukan cincin siklobutan. Kegagalan repair CPD dapat menyebabkan mutasi pada gen yang berperan pada karsinogenesis tumor kulit seperti gen *p53*.

Pemaparan sinar UV dilakukan sebanyak 3-5 kali seminggu dengan durasi 6 menit yang diikuti perlakuan sesuai kelompoknya. Frekuensi pemaparan yang berbeda-beda disebabkan oleh terbatasnya peralatan lampu UV, karena alat ini juga digunakan untuk terapi pasien dan peneliti lain. Pada penelitian ini terjadi penurunan berat badan hampir pada semua kelompok mencit yang cukup signifikan. Juga terjadi insidensi kematian mencit sejak minggu kedua pemaparan UV. Kemungkinan karena usia mencit yang masih terlalu muda, sehingga tidak dapat menahan efek samping dari sinar UV. Selain itu kontrol negatif yang tidak mendapat perlakuan apapun juga mengalami kematian. Hal ini diduga karena hewan uji mengalami infeksi yang tidak dapat dikendalikan. Insidensi kematian dapat dilihat dalam Gambar 3.



Gambar 2. A. Tanaman Jinten hitam (*Nigela sativa*) B. Biji *Nigela sativa*



Gambar 3. Insidensi kematian mencit pada penelitian I

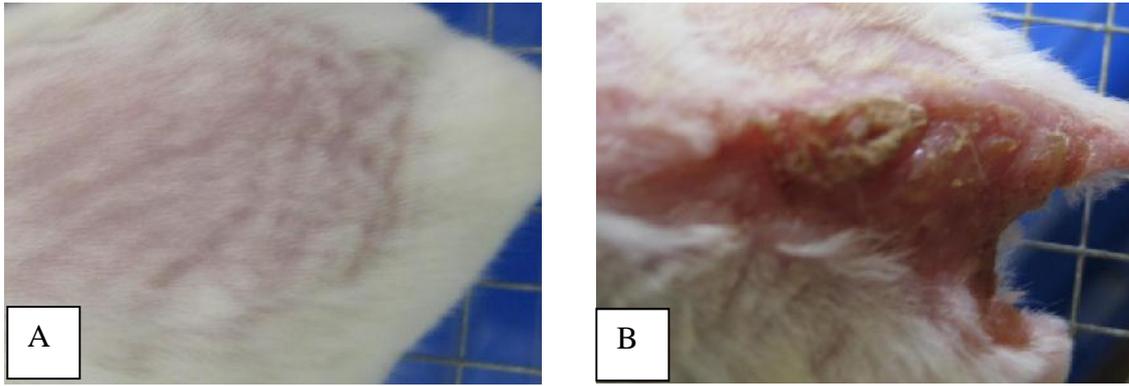
Karena kejadian ini, maka penelitian diulang dengan subyek uji mencit berumur 12 minggu, dengan jumlah mencit masing-masing kelompok sebanyak 12 ekor, kecuali kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan sebanyak 7 ekor. Pada penelitian ini insidensi kematian tetap terjadi, namun lebih sedikit dibandingkan penelitian tahap pertama. Pada minggu ke-6 pemaparan jumlah mencit masing-masing kelompok mengalami penurunan karena terjadinya kematian hewan uji yaitu:

- Kel 1: Kelompok Nigela I:2 ekor
- Kel 2: Kelompok Nigela II:6 ekor
- Kel 3: Kelompok Nigela III:6 ekor
- Kel 4: Kontrol positif yang diinduksi kanker dengan UV:9 ekor
- Kel 5:Kontrol negatif tanpa perlakuan:2 ekor

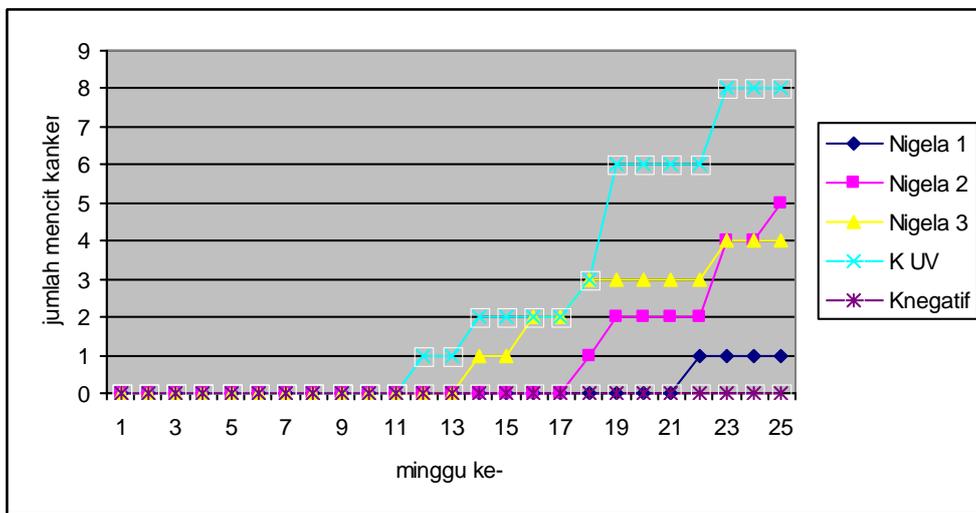
Efek ekstrak etanolik biji *N. sativa* pada insidensi kanker kulit

Pemaparan UV dilanjutkan hingga minggu ke-21 atau pemaparan ke-85, ini merupakan modifikasi dari penelitian Budiyanto (2005) dan Widyarini (2005). Pada penelitian Budiyanto pemaparan UV hingga 95 kali sedangkan penelitian Widyarini hingga 50 kali.

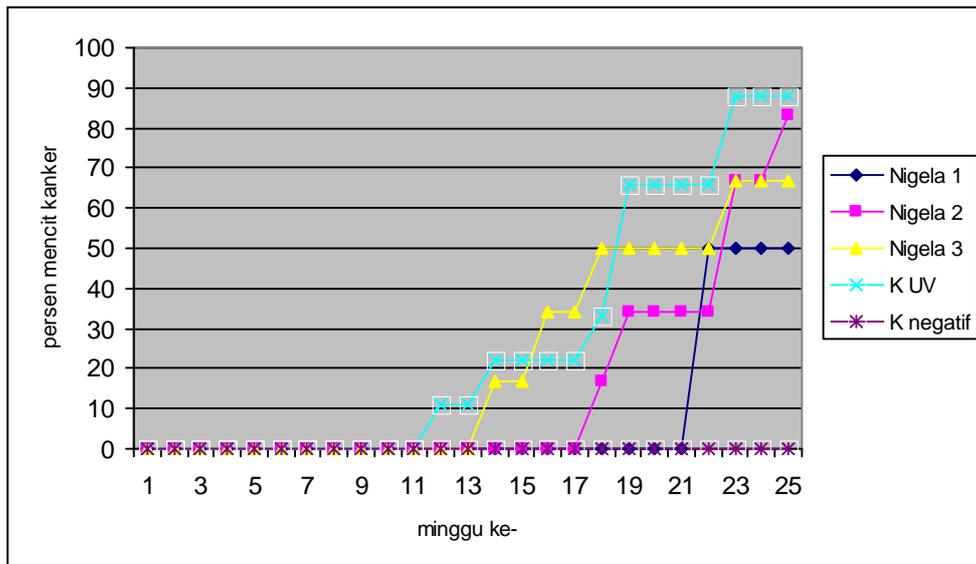
Setelah pemaparan minggu ke-10, tiap akhir minggu hewan uji diamati untuk melihat munculnya nodul tumor. Mencit kelompok kontrol negatif yang tidak dipapar sinar UV tidak mengalami kanker kulit, sedangkan mencit kelompok kontrol positif yang dipapar sinar UV mengalami kanker kulit (Gambar 4). Diakhir penelitian, mencit dikorbankan, jaringan kulit diambil untuk diperiksa secara mikroskopis. Jumlah mencit yang mengalami kanker kulit dan persentase insidensi kanker kulit dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 4. A. Kulit mencit yang tidak mengalami kanker B. Kulit mencit yang mengalami kanker



Gambar 5. Jumlah mencit mengalami kanker kulit tiap-tiap kelompok



Gambar 6. Insidensi mencit yang mengalami kanker kulit

Mencit kelompok kontrol positif yang dipapar UV mulai muncul nodul tumor pada minggu ke 11 pemaparan, sedangkan kelompok perlakuan dengan ekstrak etanolik biji *N. sativa* mengalami penghambatan munculnya tumor 2 hingga 10 minggu. Penghambatan ini terjadi kemungkinan karena dalam biji *N. sativa* terdapat senyawa yang dapat mencegah terbentuknya cyclobutane pyrimidin dimer (CPD) yang berperan pada proses karsinogenesis UV. Senyawa aktif dalam biji *N. sativa* yang bersifat sitotoksik adalah thymoquinone dan dithymoquinone (Worthen *et al.*, 1998 cit Randhawa *et al.*, 2002). Penelitian Badary dan Gamal (2001) menyimpulkan bahwa thymoquinone menurunkan insidensi dan *multiplicity* tumor lambung yang diinduksi oleh benzo-a-pyrene.

Efek ekstrak etanolik biji *N. sativa* pada tumour multiplicity

Jumlah nodul tumor pada kulit mencit dicatat tiap minggu untuk mengetahui efek antikarsinogenesis ekstrak. Semakin sedikit jumlah nodul tumor yang muncul menunjukkan meningkatnya efek antikarsinogenesis. Rata-rata jumlah nodul tumor tiap mencit dapat dilihat pada Gambar 7.

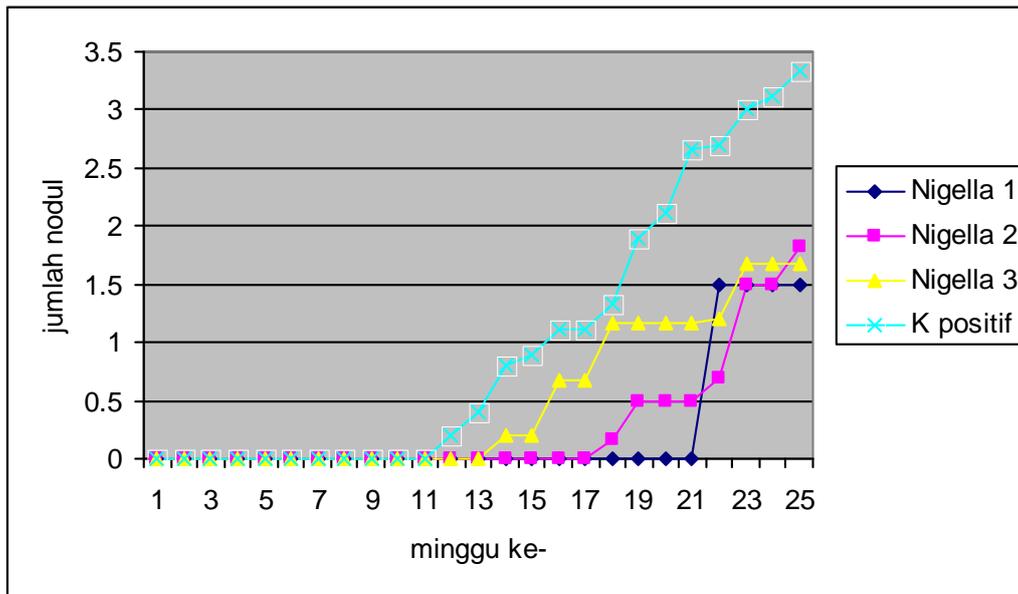
Tumour multiplicity atau rata-rata jumlah nodul tumor permencit pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya penurunan dibanding kelompok kontrol UV yang tidak diberi ekstrak etanolik biji *N. sativa*. Penurunan *tumour multiplicity* berkisar antara 45-55%. Meskipun *tumour multiplicity* pada masing-masing kelompok terlihat berbeda, namun setelah dianalisis dengan uji statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dengan taraf

kepercayaan 95% menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna.

Efek ekstrak etanolik biji *N. sativa* pada gambaran histologi kulit

Untuk meyakinkan bahwa nodul yang muncul adalah kanker kulit, dilakukan analisis mikroskopis terhadap jaringan kulit dengan pengecatan HE. Hasil pengamatan histologis kulit pada kelompok kontrol tanpa perlakuan menunjukkan tidak ada perubahan apa-apa dengan penampakan epidermis tipis terdiri dari 2-3 lapis sel dan lapisan tanduk (keratin) tipis di bagian permukaannya. Pada kelompok kontrol positif yang dipapar UV tampak bahwa sel-sel epidermis mengalami hiperplasi dan pertumbuhan ke arah bawah (arah dermis) terlihat berupa semakin tebalnya sel-sel epidermis dengan inti banyak dan besar terutama pada stratum basale epidermis, serta bentuk sel yang tidak teratur (Gambar 7), lapisan tanduk (keratin) di bagian permukaan mengalami penebalan dan juga mengalami pertumbuhan ke arah dermis dalam jumlah besar umumnya disebut sebagai "keratin terjebak" karena keratin ini tumbuh pada tempat yang tidak semestinya. Di samping itu juga terjadi radang kulit berat di bagian dermis terekspresikan dengan terjadinya hiperemis dan akumulasi limfoblast.

Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi kanker kulit stadium awal dan bersifat *in situ*, dengan bentuk sel sebagian terdiferensiasi sempurna dan sebagian tidak. Mencit yang diberi ekstrak etanolik biji *N. sativa* sebagian juga mengalami kanker kulit dan menunjukkan gambaran histologi yang lebih baik dibandingkan dengan mencit kelompok kontrol positif.



Gambar 7. Rata-rata jumlah nodul tumor tiap mencit

Mencit yang diberi ekstrak etanolik biji *N sativa* yang tidak muncul nodulnya (sebagai penanda positif terjadi kanker) menunjukkan gambaran histologi kulit yang normal. Untuk mengetahui perbedaannya secara molekuler, dilakukan analisis dengan penetapan ekspresi p53.

Gen *p53* merupakan *tumor suppressor gen* yang berperan pada mekanisme apoptosis. Pada kanker, mekanisme apoptosis ini hilang, karena mutasi pada gen *p53* (Hanahan and Weinberg, 2000), sehingga ekspresi protein p53 menurun.

Efek ekstrak etanolik biji *N. sativa* pada ekspresi p53

Apoptosis memiliki peran yang amat penting untuk menjaga homeostatis perkembang-biakan sel. Peran penting apoptosis adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan dan diperkirakan dapat menyebabkan kanker (Meiyanto, 1999). Salah satu mekanisme apoptosis dimulai dari ditemukannya kerusakan DNA. Kemudian *p53 tumor suppressor*

protein akan meng-upregulasi ekspresi protein proapoptosis (Bax, KILLER/DR5, NOXA) yang akan memerintahkan mitokondria untuk mengeluarkan sitokrom C. Sitokrom C ini akan mengkatalisis terjadinya apoptosis (Nakamura, 2003).

Pada kanker, mekanisme apoptosis ini hilang, karena mutasi pada gen *p53* (Hanahan and Weinberg, 2000). Menurunnya ekspresi protein p53 dapat menjadi tolok ukur proses karsinogenesis. Senyawa kemo-preventif dapat menghambat proses karsinogenesis dengan cara mencegah terjadinya mutasi *gen p53*, sehingga mekanisme apoptosis dapat berlangsung dengan akibat dapat membatasi proliferasi sel.

Dalam penelitian ini, ekspresi protein p53 dianalisis pada sel-sel epidermis dengan menghitung jumlah sel yang positif mengekspresikan protein p53 ditandai dengan warna coklat sampai coklat kehitaman pada inti sel. Hasil analisis ekspresi protein p53 dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Prosentase sel yang mengekspresikan p53

KELOMPOK	Prosentase sel p53 positif
<i>N. sativa</i> 100mg/kgBB	8 ± 2 ^a
<i>N. sativa</i> 200mg/kgBB	7.6 ± 1.646545 ^a
<i>N. sativa</i> 400mg/kgBB	37.6 ± 21.79057 ^b
Kontrol positif	5.1 ± 1.018019 ^c

Ket.: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Mencit yang diberi ekstrak etanolik biji *N sativa* mengekspresikan protein p53 lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Analisis ekspresi p53 menggunakan uji statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan adanya perbedaan signifikan. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji statistik Man Whitney U Test. Terlihat bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanolik biji *N sativa* dosis 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan 400mg/kgBB berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Tetapi dosis 100mg/kgBB dan 200mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Peningkatan dari dosis 100mg/kgBB menjadi 400mg/kgBB meningkatkan ekspresi p53 yang signifikan dibandingkan dengan dosis 100mg/kgBB menjadi 200mg/kgBB.

KESIMPULAN

Penggunaan ekstrak etanolik biji *N. sativa* setelah pemaparan ultraviolet dapat menurunkan insidensi kanker kulit mencit sebesar 5,3%-43,2%, menurunkan *tumor multiplicity* 45-55% tetapi secara statistik tidak signifikan, menunjukkan gambaran histopatologik kulit yang lebih baik, meningkatkan ekspresi p53 yang secara statistik berbeda signifikan.

KEPUSTAKAAN

- Anonim 1979. *Materia Medika*. Jilid III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 112.
- Anonim 1985. *Tumbuhan Obat Indonesia*. Jilid I. Dep Kes RI. Jakarta. 41.
- 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. 2002.
- Backer CA, and van den Brink Jr RCB 1968, *Flora of Java*, vol. II, Published Under The Auspices of The Ryksherbarium, Leiden,
- Badary OA, and Gamal El-din AM 2001. Inhibitory effect of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. In Randhawa MA, Mastoor S and Al Ghamdi. 2002. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J. Med. Res.* 41 (2).
- Burits M, and Bucar F 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* 14 (5):323-328.
- Budiyanto A 2005. UV-induced DNA damage, skin carcinogenesis, and its prevention dalam seminar "Peranan Biologi Molekuler dalam bidang kesehatan", FK UGM Yogyakarta.
- Dhawan D, Balasubramanian S, Amonkar AJ, and Singh N 1999. Chemopreventive effect of 4'-demethyl epipodophyllotoxin on DMBA/TPA induced mouse skin carcinogenesis. *J of Carcinogen.* 20(6): 997-1003.

- El-Kadi A, and Kandil O 1986. Effect of *Nigella sativa* (the black seed) on immunity. In Randhawa MA, Mastoor S and Al Ghamdi. 2002. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. Pakistan J. Med. Res. 41 (2).
- Elsayed I, and Fukushima S 2003. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L) seeds against rat colon carcinogenesis. J. of Nutrit and Cancer. 45 (2):195-202
- Hanahan D, and Weinberg RA 2000. The Hallmarks of Cancer, Cell, 100,57-70.
- Hutapea JR 1994. Inventaris Tanaman Obat Indonesia Jilid III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta.
- Jones CLA 2000. Herbal Aids For Cancer. Nutrition Science News dalam Chiro.org. www. Chiro.org.
- King RJB 2000. Cancer Biology, 2nd edition, Pearson Education Ltd., London.
- Mardiswoyo, dan Rajakmangunsudarso 1985. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Balai Pustaka. Jakarta. 94-94
- Meiyanto E 1999. Kurkumin sebagai anti-kanker; menelusuri mekanisme aksinya (Review), MFI, 10 (4),224-230.
- Mouhajir F, Pederson JA, Rejdali M, and Towers GHN 1999. Antimicrobial thymohydroquinones of Moroccan *Nigella sativa* seeds Detected by Electron Spin Resonance. J. of Pharmaceutic Biol. 1388-0209/99/3705-39.
- Mukhtar A 2002. Kanker kulit dalam Deteksi Dini Kanker, Balai Penerbit FK UI, 76-84.
- Nafrialdi, dan Gan S 1995. Antikanker. dalam Ganiswara, S.G. (ed.). Farmakologi dan Terapi Edisi 4. Bagian Farmakologi FKUI. Jakarta, 686-701.
- Randhawa MA, Mastoor S, and Al Ghamdi 2002. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. Pakistan J. Med. Res. 41 (2).
- Sukardja IDG 2000. Onkologi Klinik, Airlangga University Press, Surabaya
- Surh Y 1999. Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, Mut. Res. 428, 305-327.
- Surh Y 2003. Cancer Chemoprevention With Dietary Phytochemicals. Nature Revs.3. ; 768-780.
- Tjindarbumi D, dan Mangunkusumo R 2002. Cancer in Indonesia, Present and Future, Jpn. J. Clin. Oncol. 32 (Supplement 1) ,17-21.
- Triningsih E 2002. Kanker dan Permasalahannya dalam Seminar Pengobatan Komplementer pada Penderita Kanker, Yayasan Kucala Yogyakarta.
- Worthen Dr, Ghosheh OA, and Crooks PA 1998. The in vitro anti-tumour activity of some crude and purified components of black-seed, *Nigella sativa*. In Randhawa MA, Mastoor S and Al Ghamdi. 2002. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. Pakistan J. Med. Res. 41 (2).
- Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaovi K, Amarouch H, and Hassar M 2002. Acute and Chronic Toxicity of *Nigella sativa* fixed oil, Phytomedicine 9 (1) : 69-74. www.elsevier.com. 2002.