

**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK JINTEN HITAM (*Nigella sativa*)
TERHADAP INDEKS APOPTOSIS ADENOKARSINOMA MAMMAE
SECARA *in vivo***

**Studi Eksperimental Mencit galur C3H yang Diinokulasi Sel
Adenokarsinoma Mammae**

Agus Suprijono, Sumarno, Anjelia Paramita

Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung
(UNISSULA) Semarang

ABSTRAK

Jinten hitam (*Nigella sativa*) merupakan salah satu dari genus *nigella* yang termasuk dalam family *Ranunculaceae*. Kandungan utamanya yaitu thymoquinone (TQ). Penelitian sebelumnya menunjukkan minyak Jinten hitam (*Nigella sativa*) meningkatkan indeks apoptosis pada adenokarsinoma mammae secara invitro. Namun, saat ini belum ada yang menjelaskan tentang pemberian minyak Jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap indeks apoptosis adenokarsinoma mammae secara invivo. Tujuan penelitian ini membuktikan bahwa adanya pengaruh minyak Jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap indeks apoptosis adenokarsinoma mammae secara invivo.

Penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post test only control group design*, menggunakan hewan coba mencit C3H sebanyak 24 ekor yang telah diinokulasi jaringan tumor, kemudian bagi menjadi 4 kelompok secara random. Kelompok kontrol diberikan pakan standart, kelompok perlakuan 1 ditambahkan minyak Jinten hitam (*Nigella sativa*) 0,1 ml/hari, kelompok perlakuan 2 ditambahkan 0,2 ml/hari, kelompok perlakuan 3 ditambahkan 0,3 ml/hari. Penilaian indeks apoptosis dengan metode Aihara *et al.* Untuk membedakan indeks apoptosis antar berbagai kelompok perlakuan digunakan uji oneway annova.

Hasil rerata indeks apoptosis pada kelompok kontrol ($1,00 \pm 0,237$), kelompok perlakuan 1 ($1,28 \pm 0,117$), kelompok perlakuan 2 ($1,56 \pm 0,055$), dan kelompok perlakuan 3 ($1,86 \pm 0,163$). Terdapat perbedaan secara bermakna indeks apoptosis adenokarsinoma mammae antar berbagai kelompok ($p=0,000$). Untuk membedakan indeks apoptosis antar 2 kelompok perlakuan digunakan Uji Post-hoc Tukey HSD didapat ($p<0,05$) yang menunjukkan bahwa adanya perbedaan secara bermakna.

Pemberian minyak Jinten hitam (*Nigella sativa*) secara invivo meningkatkan indeks apoptosis adenokarsinoma mammae. Terdapat peningkatan indeks apoptosis yang signifikan pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis 0,3 ml/hari.

Kata Kunci : Adenokarsinoma Mammae, minyak Jinten hitam (*Nigella sativa*), Indeks apoptosis.

ABSTRACT

Black cumin (*Nigella sativa*) is one of *nigella* genus belonging to the family Ranunculaceae. The main content of the thymoquinone (TQ). Previous research shows black Cumin Oil (*Nigella sativa*) increased apoptotic index in mammary adenocarcinoma in vitro. However, there is currently no provision describing black Cumin Oil (*Nigella sativa*) against the apoptotic index of mammary adenocarcinoma in vivo. The purpose of this study prove that the influence of Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) against the apoptotic index of mammary adenocarcinoma in vivo.

Experimental research laboratory with the study design post test only control group design, using experimental animals C3H mice were 24 tails that have been inoculated tumor tissue, then divide into 4 groups randomly. The control group given standard feed, the treatment group added a black Cumin Oil (*Nigella sativa*) 0.1 ml / day, treatment group 2 was added 0.2 ml / day, treatment group 3 was added 0.3 ml / day. Assessment of apoptotic index by the method of Aihara et al. To distinguish the apoptotic index between treatment groups used a variety of test annova Oneway.

The results mean apoptotic index in the control group (1.00 +0.237), treatment group 1 (1.28 +0.117), treatment group 2 (1.56 +0.055), and three treatment groups (1.86 +0.163). There are significant differences in apoptotic index of mammary adenocarcinomas among various groups ($p = 0.000$). To distinguish the apoptotic index between two treatment groups were used post-hoc Tukey HSD test ($p < 0.05$) indicating that the presence of significant differences.

Giving Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) in vivo increased apoptotic index of mammary adenocarcinoma. There is a significant increase in apoptotic index in the treated group 3 with doses of 0.3 ml / day.

Key words: mammary adenocarcinoma, Black Cumin Oil (*Nigella sativa*), apoptotic index.

PENDAHULUAN

Jinten hitam (*Nigella sativa*) merupakan salah satu dari genus *Nigella* yang memiliki kurang lebih 14 spesies tanaman yang termasuk dalam family *Ranunculaceae* (Aggarwal *et al*, 2008). Studi mengenai kandungan biokimianya sebelumnya telah membuktikan bahwa kandungan jinten hitam (*Nigella sativa*) yang berperan adalah asam lemak esensial, fixed oil, thymoquinone (TQ) dan dithymoquinone (DTQ) serta triterpene saponin.

Penelitian yang dilakukan di Tennessee tentang pengaruh minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap indeks apoptosis sel adenokarsinoma mammae secara in vitro membuktikan bahwa aktivitas anti kanker jinten hitam (*Nigella sativa*) terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain sitotoksik pada sel kanker, sitoprotektif terhadap sel normal, antioksidan, efek terhadap beberapa mediator inflamasi, dan memicu apoptosis melalui senyawanya yaitu thymoquinone. Tetapi sampai saat ini belum ada yang menjelaskan tentang pengaruh minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap indeks apoptosis adenokarsinoma mammae secara in vivo (Ahmed, 2003).

Apabila penelitian ini tidak dilakukan tentu saja akan sangat merugikan, mengingat bahwa induksi terhadap apoptosis merupakan mekanisme yang paling potensial dalam melawan adenokarsinoma mammae. Hal ini dikarenakan perkembangan payudara normal dikontrol oleh keseimbangan antara proliferasi sel dan apoptosis. Gangguan keseimbangan antara apoptosis dan proliferasi merupakan faktor penting untuk terjadinya perkembangan dari tumor (tumorigenesis) dan progresi tumor. Disamping itu insiden kanker payudara semakin meningkat dikarenakan penurunan regulasi dari protein apoptosis (Johnson, 2001). Apabila penelitian ini terbukti benar maka minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) mempunyai manfaat yang lebih luas dalam pengobatan kanker payudara melalui mekanisme induksi apoptosis sel adenokarsinoma mammae secara in vivo.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) dan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah Indeks apoptosis jaringan adenocarcinoma mammae. Minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) didapatkan dengan membeli minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) dengan merek Habbatussauda yang di Produksi oleh PT Alomampa Persada.

Dua puluh empat ekor mencit C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu secara *ad libitum*. Kemudian dibagi menjadi 4 kelompok dengan masing-masing terdiri atas 6 ekor mencit yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum *ad libitum*. Setelah timbul benjolan diberikan minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) sesuai pembagian kelompok perlakuan:

- Kelompok Kontrol (K): mencit diinokulasi jaringan tumor dan diberi aquadest selama 3 (tiga) minggu.
- Kelompok Perlakuan 1 (P1): mencit diinokulasi jaringan tumor, setelah timbul benjolan mendapat minyak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,1 ml/hari selama 3 (tiga) minggu.
- Kelompok Perlakuan 2 (P2): mencit diinokulasi jaringan tumor, setelah timbul benjolan mendapat minyak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,2 ml/hari selama 3 (tiga) minggu.
- Kelompok Perlakuan 3 (P3): mencit diinokulasi jaringan tumor, setelah timbul benjolan mendapat minyak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,3 ml/hari selama 3 (tiga) minggu.
- Setelah perlakuan selesai, Mencit dibunuh dengan cara dislokasi cervical, kemudian diambil jaringan tumornya. Jaringan tumor tersebut dibuat blok parafin dan diproses menjadi preparat histologi. Setiap mencit dari masing-masing kelompok dibuat 2 preparat histologi.

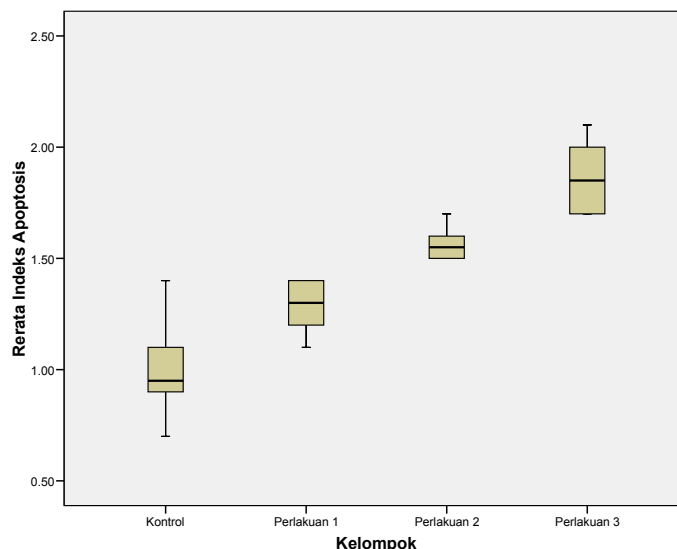
Pembacaan preparat histologi menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali, 100 kali dan 400 kali. Penentuan indeks apoptosis jaringan adenokarsinoma mammae berdasarkan kriteria Aihara M *et al*. Apoptosis biasanya melibatkan satu atau sekelompok sel yang terlihat dengan

potongan yang diwarnai HE sebagai masa bulat atau oval dengan sitoplasma yang sangat eosinofilik. Kromatin inti memadat dan beragregasi di tepi, di bawah membran inti menjadi massa berbatas tegas pada berbagai bentuk dan ukuran (Stricker dan Kumar, 2007). Sel-sel melisut dengan cepat, membentuk kuncup sitoplasmik, dan fragmen sehingga dinamakan badan-badan apoptotik (*Apoptotic Bodies*). Sel tersebut akan tampak sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran inti kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik, kadang gambaran inti kromatin terlihat pecah, dengan sitoplasma yang eosinofilik. Sering terlihat *apoptotic bodies* terpisah dari sel-sel di sekitarnya yang intak dengan gambaran halo yang jelas (Abbas dan Litchman, 2004).

Data yang diperoleh dari 4 kelompok penelitian ditabulasi dan diolah menggunakan program komputer SPSS. Untuk mengetahui normalitas dan homogenitas data dianalisa dengan uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's test*. Data memenuhi syarat uji parametrik yakni berdistribusi normal dan varian homogen, maka data tersebut dianalisis dengan uji *one-way anova*. Didapatkan nilai $p < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna antara keempat kelompok. Kemudian, untuk mengetahui perbedaan antara satu kelompok dengan kelompok lainnya dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD*. Didapatkan nilai $p < 0,05$; maka terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok satu dengan lainnya.

HASIL PENELITIAN

Hasil perhitungan rerata indeks apoptosis tiap kelompok sebagai berikut:



Indeks apoptosis meningkat pada pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) selama 3 minggu dengan dosis yang berbeda-beda yaitu 0,1 ml/hari, 0,2 ml/hari, dan 0,3 ml/hari. Pada kelompok kontrol yang tidak diberikan minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) menunjukkan indeks apoptosis yang rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, dan pada kelompok perlakuan 3 menunjukkan indeks apoptosis yang meningkat. Pada kelompok kontrol dengan nilai rerata $1,00 \pm 0,237$, kelompok perlakuan 1 pemberian dosis 0,1 ml/hari dengan nilai rerata $1,28 \pm 0,117$, kelompok perlakuan 2 pemberian dosis 0,2 ml/hari dengan nilai rerata $1,56 \pm 0,055$, dan pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis 0,3 ml/hari dengan nilai rerata $1,86 \pm 0,163$ menunjukkan rerata indeks apoptosis yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2. Semakin tinggi dosis minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) yang diberikan, maka semakin banyak indeks apoptosis.

Dari hasil penelitian dilakukan uji homogenitas menggunakan *levene test* didapatkan data homogen dengan $p = 0,262$ ($p > 0,05$), serta dilakukan uji normalitas menggunakan *shapiro-wilk* didapatkan sebaran data normal dengan ($p > 0,05$).

Nilai p pada uji normalitas

Kelompok	Nilai p
Kontrol	0,719
Perlakuan 1	0,421
Perlakuan 2	0,091
Perlakuan 3	0,505

Sehingga uji statistik menggunakan uji statistik *One-way annova*. Pada uji statistic *One-way annova* menunjukkan bahwa nilai p adalah 0,000 ($p < 0,05$), hal ini menunjukkan paling tidak terdapat perbedaan indeks apoptosis secara bermakna pada tiap-tiap kelompok.

Untuk membedakan antar 2 kelompok perlakuan digunakan Uji statistik *Post hoc TukeyHSD*

Nilai p pada uji statistik *Post hoc Tukey HSD*

Pasangan kelompok	Nilai p
Kelompok kontrol dengan perlakuan 1	0,029*
Kelompok kontrol dengan perlakuan 2	0.000*
Kelompok kontrol dengan perlakuan 3	0,000*
Kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 2	0,029*
Kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 3	0,000*
Kelompok perlakuan 2 dengan perlakuan 3	0,020*

Keterangan : tanda * perbedaan yang signifikan

Pada uji statistik *post hoc Tukey HSD* didapatkan nilai $p < 0,05$ yang artinya menunjukkan perbedaan yang signifikan pada beberapa pasangan kelompok perlakuan yaitu pada kontrol dengan kelompok perlakuan 1, kontrol dengan kelompok perlakuan 2, kontrol dengan kelompok perlakuan 3, kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2, kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 3, kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa Thymoquinone mempunyai efek meningkatkan apoptosis pada kanker payudara. Thymoquinone memiliki peranan dalam siklus sel yang mampu mempengaruhi terjadinya apoptosis dalam mengatur kontra-apoptotic protein. Hal ini dibuktikan pada tumor papiloma keratinosit pada tikus yaitu adanya peningkatan pada *tumor suppressor gene (P53)* dapat meningkatkan indeks apoptosis melalui jalur intrinsik (*Dependent mitochondria*). Induksi apoptosis oleh zat aktif thymoquinone telah dibuktikan pada *myeloblastic leukemia HL-60 cells* dengan ikatan p53 melalui pengaktifan caspase- 3, 8 dan 9 (El-Mahdy *et al*, 2005). Pada caspase-8 aktivitas paling tinggi setelah 1 jam, sedangkan caspase-3 aktivitas paling tinggi setelah 6 jam masing-

masing. Pengamatan ini diterangkan dengan alasan sesuai peraturan pro-apoptotic Bax serta di bawah-peraturan kontra-apoptotic Bcl-2 protein sehingga akan meningkatkan rasio Bax/Bcl-2. Dengan begitu TQ dapat menginduksi apoptosis. Oleh karena itu thymoquinone menjanjikan untuk pengobatan sebagai anti kanker (Aggarwal *et al*, 2008).

Pengaruh minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) terhadap indeks apoptosis sel adenokarsinoma mammae secara *in vitro* mendapatkan kesimpulan bahwa setelah pemberian thymoquinone, p53 akan meningkat dan tingkat Bcl-Xl dalam kanker payudara akan menurun. Disisi lain level dari protein Bax meningkat secara signifikan setelah pemberian thymoquinone (Ahmed, 2003).

Adenokarsinoma mammae berasal dari jaringan epitel kelenjar payudara sangat dipengaruhi oleh faktor hormonal dan genetik. Estrogen merupakan hormon yang paling berperan, jalur perangsangan hormon ini mampu meregulasi pertumbuhan jaringan kelenjar payudara melalui pengaruh pada siklus sel, apoptosis, dan motilitas sel. Faktor genetik yang paling berperan pada karsinogenesis kanker payudara adalah mutasi pada *BRCA1* dan *BRCA2*, kedua gen ini merupakan gen penekan tumor yang memfasilitasi perbaikan DNA (Arrick, 2008).

Faktor hormonal dan genetik adenokarsinoma mammae telah terbukti pada mencit C3H yang menunjukkan jaringan kanker pada kelenjar payudara akan timbul secara spontan pada mencit ini tanpa harus diinokulasi dengan jaringan kanker. Angka kejadiannya mencapai 99% pada mencit C3H betina saat usia 7 bulan dan hanya 1% pada mencit C3H jantan. Tipe jaringan adenokarsinoma mammae yang paling sering timbul pada mencit C3H adalah tipe asinus (*Data Sheet of C3H Inbred Mice*, 2010)

Keterbatasan dalam penelitian ini ialah menggunakan pengecatan HE. Pengecatan HE membutuhkan pembacaan berulang-ulang sel yang mengalami apoptosis karena sulit untuk menentukan sel yang mengalami apoptosis, karena proses apoptosis tidak menimbulkan proses inflamasi sehingga sulit untuk dideteksi secara histologis dengan pengecatan HE.

KESIMPULAN

Pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) berpengaruh terhadap indeks apoptosis pada mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mammae mencit C3H secara in vivo.

Pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 0,1ml/hari, 0,2 ml/hari, dan 0,3 ml/hari, selama tiga minggu berpengaruh meningkatkan indeks apoptosis jaringan adenokarsinoma mammae pada mencit C3H secara in vivo.

SARAN

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh yaitu untuk penelitian lebih lanjut menggunakan pewarnaan TUNNEL yang berbeda dengan peneliti yang menggunakan *Hematoksilin dan Eosin*.. Perlu digunakan dosis pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis terkecil yang berbeda dengan peneliti.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2003, *Cellular and Molecular Immunology*, 5th edition, Saunders, Philadelphia, 391-403.
- Ahmed M Shoieb., 2003., *In vitro inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Cancer Cell Lines by Thymoquinone*, International Journal of Oncology 22; 107-113.
- Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. 2008. *Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention*.
- Arrick, B.A., 2008, Breast Cancer, in: Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., Thompson, C.B., *The Molecular Basis of Cancer*, 3rd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 423-428.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA., 2005, *Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells*. Int J Cancer 117, 409-417.

Johnson, I.T., 2001, *Mechanisms and possible anticarcinogenic effect of diet related apoptosis in breast cancer. Nutr Res Rev.* 14:229-256.

Stricker, T.P., Kumar, V., 2007, Neoplasia, in: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins Basic Pathology, 8th edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 170-208.