

**UJI SITOTOKSISITAS DAN ANTIPROLIFERATIF
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL
BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa*, *Lour*)
TERHADAP SEL MIELOMA**

**THE CYTOTOXICITY AND ANTIPROLIFERATIF
TEST ETHYL ACETATE FRACTION OF ETHANOLIC
EXTRACT OF BLACK SEED (*Nigella sativa*, *Lour*)
OF MYELOMA CELL**

Laela Hayu Nurani

*Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
Jl. Prof. Dr. Supomo, Yogyakarta, Telp (0274) 379418*

Abstrak

*Kanker merupakan penyakit karena sel yang berproliferasi secara pesat dan terus-menerus (proliferasi). Jinten hitam (*Nigella sativa*, *L.*) merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksitas dan antiproliferasi ekstrak etanol dari biji jinten hitam (*Nigella sativa*, *L.*) terhadap sel Mieloma. Ekstrak etanol diperoleh dari serbuk biji jinten hitam dengan metode penyarian maserasi yang selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan etil asetat. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menginkubasi sel Mieloma dengan perlakuan ekstrak etanol biji jinten hitam (*Nigella Sativa*, *L.*) dengan beberapa seri kadar yaitu 2000; 1000; 500; 250 dan 62,5 µg/ml. Pengujian dilakukan dengan metode MTT kemudian dihitung persen kematiannya. Nilai LC_{50} dihitung dengan menggunakan analisis probit. Penelitian dilanjutkan dengan uji antiproliferasi dengan menentukan doubling time pada perlakuan sampel kadar 125 µg/ml dan 62,5 µg/ml dengan kontrol sel pada jam ke-24, 48, dan 72. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji jinten hitam bersifat sitotoksik terhadap sel Mieloma dengan harga LC_{50} sebesar 177,01 µg/ml. Hasil uji antiproliferasi menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan. Nilai doubling time sebesar 253 jam pada kadar 62,5 µg/ml, 298,4 jam pada kadar 125 µg/ml sedangkan pada kontrol sel adalah 54,52 jam,*

Kata kunci : *Kanker, biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* *L.*), sitotoksik*

Abstract

Cancer is the formation of new tissue which is abnormal and malignant. A group of cells suddenly become disorganized and reduplicate themselves rigorously (hyperproliferation). Nigella sativa L. is one of the herbs which have an anticancer effect. This research aims to assess the cytotoxic and antiproliferative effect of Nigella sativa L. ethanol extract of Myeloma cells. Ethanolic extract was produced from Nigella sativa L. powder with maseration method. The cytotoxicity test was done by incubating Myeloma cells with the treatment concentration group of N. sativa L. ethyl acetic fraction of ethanolic extract 2000; 1000; 500; 250; and 62,5 µg/ml, respectively. The test was done with an MTT method and then with a calculation of its death percentage. The LC₅₀ is calculated using a probit analysis method. The test was then continued with the antiproliferative test to assess the doubling time at treatment concentration 125; 62,5 µg/ml and cellular control at hours 24, 48, and 72. The results showed that Nigella sativa L. ethanolic extract had cytotoxic activity towards the Mieloma cells with an LC₅₀ value 177,01 µg/ml. The antiproliferative test showed that there was a growth inhibition, even cell death at the extract treatments. The doubling time was 253 hours at 62,5 µg/ml concentration, 298,4 hours at 125 ug/ml, while the cell control had 54,52 hours.

Key word : *Cancer, Nigella sativa L, cytotoxic*

PENDAHULUAN

Mieloma disebut juga *multiple myeloma*, adalah kanker sumsum tulang yang mempengaruhi produksi sel darah merah, sel darah putih, dan sel stem. Myeloma merupakan kanker darah terbesar kedua. Di negara maju kanker ini berkembang pesat dan semakin banyak menyerang orang yang berusia lebih muda (Durie, 2001).

Usaha penyembuhan kanker yang sangat sulit mendorong ditemukannya senyawa kemopreventif yaitu senyawa yang dapat digunakan untuk menghambat, menunda atau membalikkan proses terjadinya kanker (Surh, 2003). Senyawa kemopreventif dibagi menjadi 2 kategori yaitu *blocking agent* dan *suppressing agent*. Beberapa senyawa kemopreventif memiliki mekanisme aksi keduanya, *blocking* dan *suppressing* (Surh, 2002; Surh, 1999). Sayur dan buah-buahan merupakan sumber terbaik bahan pencegah kanker (Jones, 2000). Strategi penemuan antikanker meliputi sintesis organik murni, studi metabolisme spesifik sel kanker, serta eksplorasi senyawa alam (Gibbs, 2000).

Nigella sativa, L (dikenal dengan nama jinten hitam) dengan kandungan kimia asam linoleat (Rouhou, *et al.*, 2007), minyak lemak esensial (Burits and Bucar, 2000), nigellone (Dakhakhny *et al.*, 2002), terpenoid (sikloart-23-metil-7,20,22-trien-3b,30-diol), dan sukrosa (Mehta *et al.*, 2008). *Nigella sativa* dilaporkan mempunyai efek antioksidan (Burits and Bucar, 2000), penghambatan lipooksigenase (Dakhakhny *et al.*, 2002), antiinflamasi, antikanker (Tariq, 2008), analgesik (Randhawa, 2008), sitotoksik terhadap

hepatoma HepG2 cell line (Thabrew *et al.*, 2005), hepatocellular carcinoma cells (Hassan *et al.*, 2008)

Berdasarkan data-data yang tersedia tersebut, maka dapat dikatakan bahwa tanaman *Nigella Sativa*, Lour memiliki potensial untuk dikembangkan sebagai agen antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk meneliti efek sitotoksik dan antiproliferatif ekstrak etanol biji jinten hitam terhadap sel mieloma.

METODE PENELITIAN

Bahan

Sel mieloma diperoleh dari koleksi Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (UGM). Bahan tanaman berupa biji jinten hitam yang diperoleh dari tanaman yang tumbuh di Kulon Progo Yogyakarta. Bahan uji sitotoksik dan antiproliferatif: (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difenil tetrazolium bromida) (Zigma), PBS (Phosphate Buffer Saline) (Merck), Biru tripan (Gibco), Trypsin EDTA 0.25% (Gibco), Media RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640, Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) (Gibco), Penisilin –streptomisin 1% (v/v) (Gibco), Fungison 0,5% (v/v) (Gibco), PBS (Phosphate Buffer Saline), Trypsin-EDTA 0.25%, Dymethyl sulfoxide (DMSO), Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 10% dalam asam klorida 0,1 N (Merck).

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserator, LAF, mikropipet, hemositometer, *flask, plate, conical*, sentrifus, dan inkubator CO₂.

Jalannya Penelitian

a. Pembuatan Ekstrak

Biji tanaman *Nigella sativa*, L. yang telah kering, dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir beberapa kali sampai semua kotoran yang melekat hilang. Biji kering kemudian diserbuk menggunakan blender dan diayak. Serbuk diekstraksi dengan pelarut etanol 70%. Filtrat kemudian dikumpulkan kemudian diuapkan menggunakan *vaccum rota evaporator*. Ekstrak yang diperoleh dipindahkan ke dalam cawan kemudian diuapkan kembali diatas penangas air dan diangin-anginkan sampai diperoleh ekstrak yang kental. Selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan etil asetat, fraksi yang larut etil asetat dipekatkan dan digunakan untuk sampel uji.

b. Uji Sitotoksisitas dengan metode MTT

Seratus μl suspensi sel Mieloma dengan kepadatan 3×10^4 , didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada 96-well plate bersama ekstrak uji pada berbagai kadar masing-masing 2000 ; 1000; 500; 250; dan 125 $\mu\text{g/ml}$ dari stok 16.10^3 dan diinkubasikan selama 24 jam. Untuk kontrol digunakan 100 μl suspensi sel ditambah ke dalam sumuran yang berisi 100 μl medium RPMI 1640, dan untuk blanko digunakan 100 μl suspensi sel ditambahkan ke dalam sumuran yang berisi DMSO dan media. Selanjutnya sel diinkubasi dalam inkubator dengan aliran 5,0% CO_2 pada suhu 37 °C. Pada akhir inkubasi pada masing-masing sumuran ditambah 10 μl MTT sebesar 5 mg/ml dalam FBS steril, kemudian plate diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37 °C dengan aliran CO_2 5,0%. Sel yang

hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dihentikan dengan reagen stoper SDS, diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

Persentase kematian dihitung dengan cara jumlah sel hidup kontrol dikurangi jumlah sel hidup perlakuan dibagi jumlah sel hidup kontrol dikalikan 100%. Harga LC_{50} dihitung dengan analisis Probit.

c. Uji Antiproliferasi

Sel distarvasi (dipuaskan) terlebih dahulu selama 24 jam dengan media kultur yang mengandung 0,5% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Selanjutnya sel ditumbuhkan di dalam plate dengan medium yang ditambahkan kontrol dan larutan uji dengan seri kadar yang tidak mematikan (di bawah LC_{50}). Sampling dilakukan pada jam ke 24, 48 dan 72. Data yang diperoleh berupa absorbansi sel hidup yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm. Data jumlah sel yang hidup pada jam ke-0, 24, 48 dan 72 dibuat grafik antara jumlah sel yang hidup dan lama waktu inkubasi (jam), kemudian ditentukan perbedaan waktu untuk mencapai jumlah dua kali sel awal (mengetahui *doubling time*), caranya buat persamaan regresi linear antara log jumlah sel hidup dan waktu tiap perlakuan, kemudian dari persamaan dimasukkan nilai log jumlah dua kali sel awal sebagai nilai y maka akan diperoleh nilai x sebagai *doubling time* nya. *Doubling time* merupakan parameter antiproliferatif suatu bahan uji, jika *doubling time* nya lebih panjang dari kontrol negatif, maka dikatakan

bahan uji mempunyai daya anti-proliferatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

- a. Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam terhadap sel Mieloma

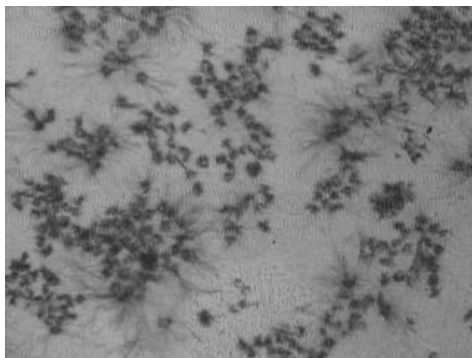
Intensitas warna ungu ini mempunyai korelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup (Mosman, 1993). Kristal formazan dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil perhitungan persentase kematian sel dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Hasil uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam terhadap sel Mieloma

Kadar (µg/ml)	Log kadar	Persentase kematian sel (%)	Probit
2000	3,301	97,41	6,949
1000	3,000	93,23	6,496
500	2,698	81,85	5,914
250	2,397	58,40	5,188
125	2,096	39,57	4,737

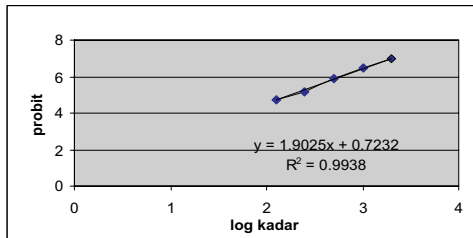
Prinsip dasar uji sitotoksitas adalah kerja enzim mitokondria pada sel aktif yang memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dan berwarna ungu.



Gambar 1. Kristal formazan

Dari hasil yang tertera pada Tabel I terlihat bahwa semakin besar kadar senyawa uji yang diberikan pada suspensi sel, semakin besar pula persentase kematian sel yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa potensi ketoksikan ekstrak etanol biji jinten hitam adalah tergantung pada kadar.

Dari data uji sitotoksitas dapat dihitung kadar yang menyebabkan kematian 50% sel yang diuji (LC₅₀) dengan metode analisis probit. Data persentase kematian sel karena pengaruh perlakuan (sampel) dikonversikan dalam nilai probit, kemudian dibuat persamaan regresi linear antara log kadar dengan probit. Persamaan regresi yang diperoleh yaitu $y = 1,9025x + 0,7232$ dengan harga $r = 0,997$. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara Log kadar fraksi larut etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam dengan Probit.

Harga LC_{50} diperoleh dengan memasukkan probit 5 ke dalam persamaan garis lurus tersebut, kemudian diperoleh harga x . Antilog dari harga x merupakan LC_{50} . Hasil perhitungan LC_{50} diperoleh 177,01 $\mu\text{g/ml}$. Ini berarti pada kadar tersebut senyawa uji dapat menyebabkan kematian sebesar 50% dari jumlah sel yang dicoba. Semakin kecil konsentrasi yang dibutuhkan untuk mematikan 50% jumlah sel berarti senyawa tersebut semakin toksik. Hasil uji sitotoksitas digunakan untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan untuk uji antiproliferatif. Dipilih dua dosis di bawah LC_{50} yaitu 125 dan 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Selanjutnya dilakukan uji antiproliferatif untuk melihat pengaruh fraksi etil asetat ekstrak etanol jinten hitam terhadap kinetika proliferasi sel.

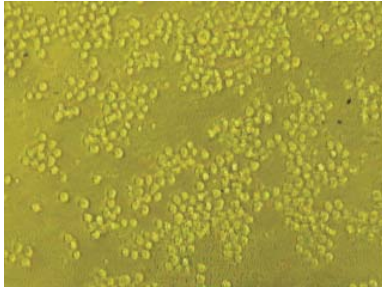
Besarnya hubungan antara log kadar sampel dengan probit yang dihitung dengan koefisien korelasi adalah 0,997. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang linear antara log kadar

dengan probit karena r hitung $>$ r tabel (r tabel = 0,8783). Hasil dari uji regresi linear menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dari masing-masing konsentrasi terhadap persen kematian.

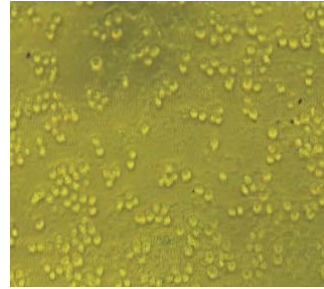
a. Uji Antiproliferatif

Pada uji antiproliferatif digunakan dua seri kadar yaitu 125 dan 62,5 $\mu\text{g/ml}$ yang ditentukan dari harga LC_{50} pada uji sitotoksitas, kadar-kadar tersebut memiliki persentase kematian dibawah LC_{50} (177,01 $\mu\text{g/ml}$). Pemilihan kadar dari larutan uji yang digunakan adalah dibawah LC_{50} agar sel dapat diamati pertumbuhannya serta morfologinya karena sel tidak banyak yang mati. Apabila digunakan kadar diatas LC_{50} dikhawatirkan sel banyak yang mati sebelum 72 jam inkubasi sehingga pengamatan kinetika proliferasi tidak dapat dilakukan dan profil pertumbuhannya tidak terlihat.

Pada pengamatan morfologi antara sel mieloma yang mengalami perlakuan ekstrak etanol biji jinten dibandingkan sel mieloma kontrol akan memperlihatkan perubahan morfologi yang berbeda. Sel yang hidup dari kontrol akan terlihat bergerombol dan menempel didasar sumuran, bentuknya bulat cemerlang sedangkan pada perlakuan terlihat adanya sel yang mati. Hal ini dapat dilihat dari bentuknya sudah berubah yaitu sudah tidak bulat lagi dan tampak gelap. Hasil pengamatan morfologi sel mieloma dapat dilihat pada Gambar 3.



(A)



(B)

Gambar 3. Morfologi sel mieloma dalam sumuran setelah diinkubasi 24 jam (A) kontrol sel (B) perlakuan kadar 125 µg/ ml.

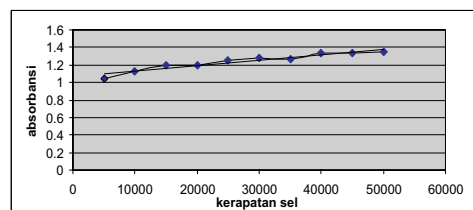
Uji antiproliferatif ini dilakukan dengan metode MTT. Data yang diperoleh berupa absorbansi sel hidup. Sampel yang berwarna dapat memberikan absorbansi sehingga absorbansi yang terbaca tidak hanya warna ungu yang sebanding dengan jumlah sel yang hidup tapi juga warna dari sampel, sehingga diperlukan adanya kontrol sampel diperlukan untuk mengeliminasi pengaruh absorbansi dari sampel yang berwarna. Hasil absorbansi perlakuan dikurangi absorbansi dari kontrol sampel, kemudian dikonversikan ke dalam jumlah sel hidup. Data jumlah sel hidup dan absorbansinya dapat dilihat pada Tabel II.

Tabel II. Variasi jumlah sel dan absorbansi yang ditetapkan dengan metode MTT pada panjang gelombang 550 nm

Jumlah sel hidup	Absorbansi
5000	1,050
10000	1,123
15000	1,196
20000	1,200
25000	1,247

30000	1,278
35000	1,273
40000	1,331
45000	1,337
50000	1,344

Dari kurva baku pada Tabel II tersebut kemudian dibuat persamaan regresi linear antara jumlah sel hidup dan absorbansi yang digunakan untuk mengkonversikan absorbansi sel hidup dari setiap perlakuan persatuan waktu. Dari persamaan regresi linear tersebut diperoleh persamaan kurva baku $y = 6,13.10^{-6}x + 1,069$ dengan harga $r = 0,961$. Grafik kurva baku dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik hubungan jumlah sel hidup dengan absorbansinya

Hasil absorbansi sel hidup pada masing-masing perlakuan persatuan waktu, yaitu pada kontrol sel, sampel kadar 125 dan 62,5 µg/ml dimasukkan pada persamaan kurva baku di atas sehingga diperoleh data jumlah sel. Hasil uji antiproliferatif dapat dilihat pada Tabel III.

Dari harga *doubling time* tersebut dapat diketahui penghambatan ekstrak etanol biji *N. Sativa*, Lour. terhadap kecepatan sel untuk berproliferasi dengan membandingkan harga *doubling time* kontrol dengan harga *doubling time* sampel.

Harga *doubling time* diperoleh

Tabel III. Hasil pengamatan uji antiproliferatif fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam terhadap sel Mieloma

Perlakuan	Log jumlah sel hidup jam ke-			
	0	24	48	72
kadar 125 µg/ml	4,301	3,643	4,564	4,129
kadar 62,5 µg/ml	4,301	3,862	4,598	4,190
Kontrol sel	4,301	4,666	4,665	4,548

Dari Tabel III dapat diketahui jumlah sel hidup pada jam ke-0, 24, 48, dan 72, selanjutnya dibuat persamaan regresi linear antara log jumlah sel hidup dengan waktu inkubasi. Hasil regresi tersebut digunakan untuk menghitung harga *doubling time*.

dari nilai log dua kali jumlah sel awal sebagai Y dikurangi harga intersep dari persamaan regresi linear waktu inkubasi *versus* log jumlah sel hidup, kemudian dibagi dengan *slopenya*. Hasil regresi linear dan harga *doubling time* sel mieloma pada berbagai perlakuan dan kontrol sel ditampilkan pada Tabel IV.

Tabel IV. Hasil pengamatan regresi linear dan harga *doubling time* sel Mieloma pada berbagai perlakuan kadar fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam

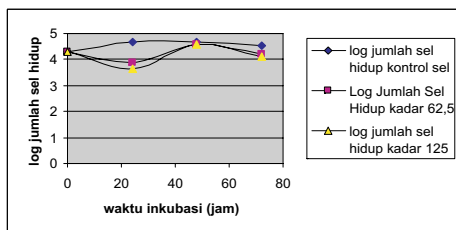
Kadar (µg/ml)	Persamaan	<i>slope</i>	Y	<i>Doubling Time (jam)</i>	R
125	$y = 1,688 \cdot 10^{-3}x + 4,089$	$1,688 \cdot 10^{-3}$	4,602	298,4	0,135
62,5	$y = 1,679 \cdot 10^{-3}x + 4,177$	$1,679 \cdot 10^{-3}$	4,602	253	0,171
Kontrol sel	$y = 3,083 \cdot 10^{-3}x + 4,434$	$3,083 \cdot 10^{-3}$	4,602	54,53	0,555

Doubling time merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat.

Berdasarkan dari Tabel IV terlihat perlakuan kontrol sel memiliki harga *doubling time* terkecil. Hal ini me-

nunjukkan bahwa kecepatan proliferasi sel dapat diperlambat dengan memberikan ekstrak etanol biji *N. Sativa*, Lour. Terlihat juga bahwa harga *doubling time* perlakuan sampel kadar 125 $\mu\text{g/ml}$ lebih besar daripada sampel kadar 62,25 $\mu\text{g/ml}$. Semakin tinggi konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam maka penghambatan proliferasinya pada sel mieloma semakin besar pula.

Kemampuan fraksi etil asetat ekstrak etanol biji *N. Sativa*, Lour. dalam menghambat proliferasi sel juga dapat dilihat dari harga *slope*. Harga *slope* yang semakin besar membuktikan bahwa semakin banyak jumlah sel yang hidup. Pada kontrol sel harga *slope* lebih besar daripada harga *slope* sampel. Hal tersebut dapat dilihat pada grafik waktu inkubasi *versus* log jumlah sel hidup pada berbagai perlakuan dan kontrol



Gambar 5. Grafik log jumlah sel Mieloma yang hidup sebagai fungsi waktu pada berbagai perlakuan kadar dan kontrol

Pada grafik (Gambar 5) terlihat bahwa *slope* sampel berada di bawah *slope* kontrol. Hal ini menunjukkan adanya penghambatan perkembangan sel setelah pemberian fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam (*N. Sativa*, Lour.). Dari data *slope* hasil uji antiproliferasi dapat diketahui bahwa dengan pemberian fraksi etil asetat

ekstrak etanol biji jinten hitam (*N. Sativa*, L.) terhadap sel mieloma baik pada kadar 125 $\mu\text{g/ml}$ maupun pada kadar 62,5 $\mu\text{g/ml}$ mampu menghambat perkembangan sel lebih lambat dari kontrol. Hal tersebut ditunjukkan dari harga *slope*. Semakin besar harga *slope* maka semakin singkat *doubling timenya*. Harga *doubling time* pada kontrol sel lebih kecil daripada sampel yang artinya bahwa dengan tidak adanya pemberian senyawa uji, sel mampu berproliferasi dalam waktu yang lebih singkat. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji jinten hitam mampu memacu *cell cycle arrest*.

Kandungan zat aktif dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam yang diduga bersifat sitotoksik dan antiproliferatif adalah minyak lemak esensial (Mbarek *et al.*, 2007), saponin (terpenoid dan steroid) (Boskabady *et al.*, 2000), tymol (Hajar, 2008). Kemungkinan titik tangkap senyawa alam seperti terpenoid berdasarkan mekanismenya sebagai antikanker antara lain menekan pertumbuhan sel CAV-1 dan menginduksi apoptosis sel kanker (Palozza *et al.*, 2008). Saponin bekerja sebagai antikanker dengan menginduksi *cell cycle arrest* dan apoptosis sel (Bachran *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Fraksi etil asetat ekstrak etanol biji jinten hitam (*Nigella sativa*, L.) mempunyai aktivitas sitotoksik secara *in vitro* terhadap sel Mieloma, dengan LC_{50} 177,01 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak ini juga mempunyai efek antiproliferatif terhadap sel Mieloma dengan kemungkinan mekanisme memacu *cell cycle arrest*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kami tujukan kepada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini melalui dana RISTEK INSENTIF DASAR Tahun 2009-2010.

DAFTAR PUSTAKA

- Bachran, C., Bachran, S., Sutherland, M., Bachran, D., Fuchs, H., 2008, Saponins in tumor therapy, *Mini Rev Med Chem*, 8, 575-84.
- Boskabady MH, Shiravi N, 2000, Inhibitory effect of *Nigella sativa* on histamine (H1) receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *Eur Respir J*;16:461s
- Burits M, Bucar F, 2000, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytother Res*, 14(5):323-8
- Dakhakhny, M.E., Madi, N.J., Lembert, N., and Ammon, H.P.T., 2002, *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J. Ethnopharmacol*, 81(2)161-164
- Durie B.G.M., 2001, Multiple Myeloma: What's New, *CA Cancer J Clin* 51;271-272
- Gibbs, J.B., 2000, Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signalling, *J. Clin Invest*, 105, 109-111
- Hassan, M.I., Mabrouk, G.M., Shenata, H.H., 2008, Antineoplastic Effects of Bee Honey and *Nigella sativa* on Hepatocellular Carcinoma Cells, *Integr Cancer Ther*, 9(4)
- Hajar, U., 2008, *Fakta Tibun Nabawi : Habbatus Sauda, Madu, dan Minyak Zaitun*, <http://www.muslimah.or.id>, diakses pada tanggal 24 Juni 2011.
- Jones, CLA.,2000. Herbal Aids For Cancer. *Nutrition Science News* dalam *Chiro.org*. www.Chiro.org.
- Mbarek, L.A., Mouse, H.A., Elabbadi, N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., ChaitA., Kamal, M, Dalal, A and Zyad, A., 2007, Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts, *Braz J Med Biol Res* 40(6) 2007
- Mehta B.K., Sharma, U., Agrawal, W., Pandit, V., Nidhi J., and Gupta, M., 2008, Isolation and characterization of new compounds from seeds of *Nigella sativa*, *Medicinal Chemistry Research*, 17(2)462-473
- Mosman, T., 1993, *Journal of Immunological Method*, hal. 55-63, 65.
- Randhawa, M.A., 2008, Black seed, *Nigella sativa*, Deserves more attention, *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 20(2) 1-2
- Rouhou, S.C., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., and Attia, H., 2007, *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction, *Food Chemistry*, 101(2), 673-681

- Surh, Y., 2003. Cancer Chemoprevention With Dietary Phytochemicals, *Nature Revs.*3.:768-80
- Surh, Y., 2002, Anti-tumor promoting potential of selected of spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review, *Food and Chem Tox*, 40, 1091-1097
- Surh, Y., 1999, Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, *Mut Res*, 428, 305-327
- Tariq, M., 2008, *Nigella sativa* Seeds: Folklore Treatment in Modern Day Medicine, *Saudi J Gastroenterol*, 14(3): 105-106
- Thabrew, M.I., Mitry, R.R., Morsy, M.A., and Hughes, R.D., 2005, Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells, *Life Sciences*, 77(12):1319-1330
- Palozza, P., Sestito, R., Picci., N., Lanza, P., Monego, G., Ranelletti, FO., 2008, The sensitivity to {beta}-Carotene Growth-Inhibitory and Pro-apoptotic Effects is Regulated by Caveolin-1 Expression in Human Colon and Prostate Cancer Cells, *Carcinogenesis*, Catholic University School of Medicine.