

Uji Teratogenik Ekstrak Minyak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa*) pada Mencit (*Mus musculus* L.) Bunting

IRIANI SETYAWATI ^{1*}, NI WAYAN SUDATRI ²

¹ Laboraturium Struktur dan Perkembangan Hewan

² Laboraturium Fisiologi Hewan

Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran,
Badung, Bali.

*Email: irianisetyawati@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh ekstrak minyak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang diberikan pada induk mencit selama masa organogenesis terhadap penampilan reproduksi dan perkembangan fetus. Empat puluh ekor mencit bunting dibagi acak menjadi empat kelompok. Ekstrak diberikan secara oral (*gavage*) dengan dosis 0 (K/ kontrol), 0,1 ml (D1), 0,2 ml (D2), dan 0,3 ml (D3). Perlakuan diberikan hari ke 6-15 kebuntingan, pada hari ke-18 mencit dikorbankan nyawanya untuk pengambilan fetus. Efek teratogenik terhadap penampilan reproduksi diamati dari jumlah fetus (hidup, mati, dan resorpsi) dan morfometri fetus (bobot, panjang dan kelainan morfologi). Data diuji normalitasnya, jika data berdistribusi normal diuji dengan *One Way Anova*, dilanjutkan uji Duncan (jika varians homogen) atau uji Dunnett (jika varians tidak homogen). Jika distribusi data tidak normal, diuji dengan Kruskal-Wallis, jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U. Efek teratogenik ekstrak minyak biji jintan hitam menunjukkan peningkatan dosis cenderung menyebabkan penurunan performans reproduksi induk (turunnya jumlah fetus hidup, peningkatan jumlah fetus mati dan resorpsi) serta peningkatan cacat bawaan (penurunan berat dan panjang fetus, serta peningkatan hemoragi).

Kata kunci: *Nigella sativa*, malformasi kongenital

ABSTRACT

This experiment was performed to examine the effects of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil extract on reproduction performance and fetus development if given during organogenesis period. Forty pregnant mice were randomly divided into four groups. Extract was treated orally by *gavage* with doses 0% (control), 0.1 ml, 0.2 ml, and 0.3 ml since gestation day 6 to 15. Caesarean section were performed to pregnant mice on day 18 to remove fetuses. Observation covered reproduction performance i.e. the foetus number (reabsorptions, dead/ alive foetus), and morphological of the foetus (weight and length of the litter, and malformations). Statistical analysis was performed using Anova and Duncan's Multiple Range Test. Teratogenic effects of black cumin oil extract caused decreasing of reproductive performance of the mother (alive foetus decreased, dead and resorbed foetus increased) and an increased incidence of birth defects (fetal weight and length and fetal hemorrhage).

Keywords: Nigella sativa, congenital malformations

PENDAHULUAN

Jintan hitam (*Nigella sativa*) adalah obat herbal yang multikhasiat dan makin marak penggunaannya belakangan ini. Kandungan zat aktif *thymoquinone* serta beragam bahan lain dalam *Nigella sativa* yang memiliki banyak manfaat bagi manusia, telah menarik minat para peneliti untuk membuktikan efek farmakologisnya secara ilmiah dengan berbagai uji praklinik dan klinik pada manusia, hewan coba, kultur sel, maupun penelitian secara *in vivo*, *in vitro*, dan molekuler. Berbagai penelitian telah membuktikan efektivitas bahan alam ini sebagai antimikroba, antibakteri (Alhaj *et al.*, 2008), antijamur (Ali dan Blunden, 2008), antiinflamasi, analgesik dan antipiretik (Al-Ghamdi, 2001), antiparasitik dan antihistamin (Al-Ali *et al.*, 2008), antihipertensi (Dehkordi dan Kamkhah, 2008),

antitumor (Lupidi *et al.*, 2010), antikanker (Shafi *et al.*, 2009), antidiabetik (Benhaddou *et al.*, 2010) serta anti astmatik (Boskabady *et al.*, 2010). Herbal multikhasiat ini juga memiliki efek protektif diantaranya hepatoprotektif (Alenzi *et al.*, 2010), renoprotektif (Yildiz *et al.*, 2010), gastroprotektif (Terzi *et al.*, 2010), neuroprotektif (Mousavi *et al.*, 2010), radioprotektif alami (Assayed, 2010), agen imunoterapi spesifik alergi (Isik *et al.*, 2010) serta antioksidan yang sangat baik (Ismail *et al.*, 2010).

Penelitian biji jantan hitam terhadap reproduksi hewan jantan menunjukkan pengaruh positif yaitu terjadinya peningkatan antara lain pada spermatogenesis, produksi spermatozoa, sekresi kelenjar prostat dan vesikula seminalis, kadar hormon testosteron dan konsentrasi protein (Al-Sa'aidi *et al.*, 2009), peningkatan fertilitas pada jantan (Mohammad *et al.*, 2009), serta efek pemulihan organ reproduksi jantan yang mengalami kerusakan akibat radiasi sinar ultraviolet (Ali dan Ali, 2009). Penelitian terdahulu pada hewan betina menunjukkan efek sebaliknya yaitu adanya aktivitas antifertilitas, antinociceptif dan kontrasepsi postcoitus (Keshri *et al.*, 1995), efek anti oksitosin (Aqel dan Shaheen, 1996) dan diduga dapat melancarkan menstruasi. Hingga saat ini belum dilakukan penelitian pengaruh biji jantan hitam jika dikonsumsi selama kehamilan, apakah aman terhadap fetus di dalam kandungan. Beberapa hasil penelitian yang menunjukkan efek negatif *Nigella sativa* terhadap reproduksi betina menimbulkan kekhawatiran sehingga perlu penelitian lebih jauh apakah herbal ini dapat menyebabkan malformasi kongenital (cacat bawaan) pada janin melalui pengujian teratogenisitas.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi Biji Jantan Hitam (*Nigella sativa*)

Ekstraksi biji *Nigella sativa* dilakukan dengan metode Alhaj *et al.* (2008). Tabung ekstraksi diisi dengan 150,0 g biji *Nigella sativa* yang telah dihaluskan. Ekstraksi dilakukan dengan SFE (*Supercritical Fluid Extraction*) dengan tekanan 400 atm dan suhu 40°C selama 15 menit fase statis dilanjutkan 20 menit fase dinamis. *Restrictor Duraflow (Suprex)* digunakan dalam SFE untuk pengumpulan hasil ekstraksi. Kecepatan aliran SFE melalui *restrictor* 25 g/menit (terkompresi). Hasil ekstraksi ditampung dalam labu volumetrik. Volume akhir ekstrak 35 ml di akhir ekstraksi. Labu volumetrik ditempatkan dalam *icebath* selama fase dinamis agar ekstraksi lebih efisien.

Pemberian Perlakuan dan Pengambilan Data

Empat puluh ekor mencit bunting dibagi menjadi empat kelompok, kelompok kontrol (K) diberi akuades dan tiga kelompok lain diberikan ekstrak dengan dosis 0,1 ml (D1), 0,2 ml (D2), dan 0,3 ml (D3). Ekstrak dicekikkan secara oral (*gavage*) pada hari ke 6-15 kebuntingan (periode organogenesis mencit). Pada hari ke-18 (sehari sebelum kelahiran normal) mencit dimasukkan ke dalam wadah tertutup kemudian diberi kapas yang telah dibasahi eter untuk dikorbakan nyawanya dan dibedah untuk pemeriksaan fetus.

Data yang diambil meliputi bobot uterus, jumlah fetus, panjang dan bobot badan fetus. Uterus ditimbang sebelum dan setelah fetus dikeluarkan dari uterus dan dihitung jumlah fetus hidup, mati, dan resorpsi dari uterus kanan dan kiri. Morfologi fetus yang diamati meliputi kelengkapan dan kelainan pada tungkai depan dan belakang, ekor, telinga, mata, bibir, langit-langit mulut, dan perdarahan bawah kulit (hemoragi). Pengamatan menggunakan kaca pembesar terhadap adanya teratologi berdasarkan atlas perkembangan mencit menurut EMAP (2009). Pengukuran panjang dan penimbangan bobot badan dilakukan setelah fetus dibersihkan dari cairan amnion yang membungkusnya.

Analisis Data

Data diuji normalitasnya, jika data berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*, dengan uji lanjut Duncan (jika varians homogen) atau uji Dunnett (jika varians tidak homogen). Jika distribusi data tidak normal, diuji dengan Kruskal-Wallis, jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney U. Struktur costae, vertebrae, dan sternbrae diamati secara deskriptif kualitatif terhadap terjadinya cacat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan yang dilakukan selama uji pendahuluan menunjukkan bahwa ekstrak minyak biji jantan hitam (*Nigella sativa*) yang diberikan selama masa kebuntingan dapat menyebabkan pendarahan pada induk mencit jika diberikan dosis diatas 0,3 ml ekstrak/ hari. Dari pengamatan ditemukan bahwa pendarahan terjadi satu hingga tiga hari sebelum kelahiran prematur, bahkan beberapa induk mati akibat pendarahan sebelum seluruh fetus berhasil dilahirkan (Gambar 1). Oleh karena itu dalam penelitian ini

tidak digunakan dosis diatas 0,3 ml, walaupun dari penelitian terdahulu oleh Zaoui *et al.* (2002) diperoleh batas LD₅₀ ekstrak minyak biji jintan hitam adalah 28,8 ml/ kg berat badan secara oral atau 0,72 ml/ ekor/ hari.

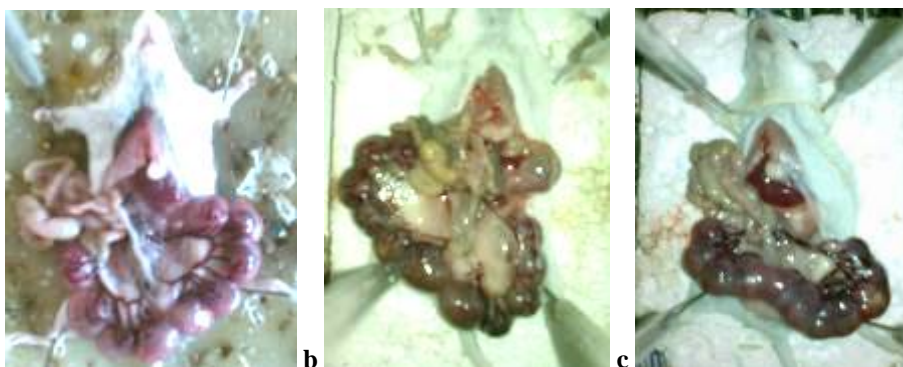


Gambar 1. Induk mencit yang mengalami pendarahan sebelum kelahiran prematur pada uji pendahuluan dengan variasi dosis diatas 0,3 ml/ ekor/ hari.

Diduga zat bioaktif utama *Nigella sativa* yaitu *thymoquinone* atau turunannya (*dithymoquinone*, *thymohydroquinone* dan *thymol*) yang digunakan di dalam penelitian ini lebih tinggi kadarnya dibandingkan yang terkandung di dalam biji *Nigella sativa* pada penelitian Zaoui *et al.* (2002). Hal ini mungkin disebabkan perbedaan iklim dan tanah di lokasi tempat tumbuh tanaman jintan hitam yang digunakan, yang menyebabkan perbedaan kadar zat aktifnya. Diduga zat bioaktif utama tersebut memiliki sifat antiestrogenik, yang menekan kadar hormon estrogen sehingga dapat memicu terjadinya perdarahan atau peluruhan dinding endometrium.

Jumlah Fetus

Pemberian ekstrak minyak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) ternyata berpengaruh terhadap jumlah total fetus dalam uterus induk (Gambar 2). Rata-rata jumlah fetus dalam uterus kanan (Tabel 1) maupun rata-rata jumlah fetus dalam uterus kiri (Tabel 2) antara kontrol berbeda ($p < 0,05$) dengan perlakuan, sedangkan diantara dosis perlakuan hanya berbeda ($p < 0,05$) antara dosis terendah (dosis 1) dengan tertinggi (dosis 3). Data jumlah fetus menunjukkan pada fetus hidup dan fetus mati terdapat perbedaan diantara masing-masing kelompok baik kontrol, maupun perlakuan dosis 1, dosis 2, dan dosis 3. Sementara itu data fetus resorpsi menunjukkan tidak berbeda nyata (Tabel 3).



Gambar 2. Uterus induk sebelum fetus-fetus dikeluarkan: a. Dosis 1 (0,1 ml ekstrak), b. Dosis 2 (0,2 ml), c. Dosis 3 (0,3 ml).

Tabel 1. Rata-rata jumlah fetus di dalam uterus induk sebelah kanan

Perlakuan	Jumlah Induk/ N	Rerata Jumlah Fetus dalam Uterus Kanan
K (Kontrol)	10	5,90 ± 0,74 a
Dosis 1	10	3,80 ± 0,92 b
Dosis 2	10	4,40 ± 1,51 bc
Dosis 3	10	3,10 ± 1,91 c

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 2. Fetus di dalam uterus induk sebelah kiri

Perlakuan	Rangking Mean	Chi Square	P Value
Kontrol	17,90 a	10,952	0,012
Dosis 1	29,65 b		
Dosis 2	20,95 ab		
Dosis 3	13,50 ac		

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 3. Fetus hidup, fetus mati, dan fetus resorbsi

Perlakuan	Jumlah Induk/ N	Rangking Mean		
		Fetus Hidup	Fetus Mati	Fetus Resorbsi
K (Kontrol)	10	33,35 a	13,50 a	16,50 a
Dosis 1	10	24,65 b	20,70 b	18,35 a
Dosis 2	10	18,20 c	22,25 c	22,05 a
Dosis 3	10	5,80 d	25,55 d	25,10 a
Chi Square		30,338	7,904	6,649
P Value		0,000	0,048	0,084

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$), lambang huruf tidak dibandingkan berdasarkan baris.

Fetus mati kemungkinan disebabkan kematian sel-sel pada tahap akhir proliferasi sehingga hanya sebagian sel yang dapat diperbaiki dan pada saat pembedahan proses resorbsi oleh induk belum sempurna sehingga biasanya fetus yang mati ditemukan dalam keadaan cacat. Menurut Widyastuti *et al.* (2006), apabila ada teratogen yang mengenai embrio pada stadium pra diferensiasi, maka pengaruhnya ialah semua atau sebagian besar sel-sel embrio akan rusak dan berakhir dengan kematian embrio. Resorbsi fetus merupakan salah satu indikasi agen yang bersifat teratogenik. Semakin tinggi tingkat dosis pada kisaran dosis embriotoksik, akan mengakibatkan terjadinya respon yang tingkatannya lebih tinggi.

Bobot dan Panjang Fetus

Secara statistik, data bobot dan panjang fetus menunjukkan terdapat perbedaan nyata diantara semua kelompok baik kontrol maupun dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 (Tabel 4). Pengamatan fetus menunjukkan adanya kelainan fetus kerdil dan bentuknya abnormal (Gambar 3). Bobot badan adalah parameter penting untuk mengetahui pengaruh senyawa asing terhadap fetus, ditunjukkan dengan penurunan bobot fetus. Laju pertumbuhan dan perkembangan fetus menentukan variasi ukuran anakan.

Rataan bobot anakan mencit normal pada umur kehamilan hari ke-18 adalah 1,4 gram. Penurunan bobot dan panjang tubuh adalah bentuk teringan efek agensia teratogenik dan merupakan parameter yang sensitif. Gangguan perkembangan individu dalam uterus menyebabkan kelainan antara lain kelahiran dengan bobot badan tidak normal. Menurut Yantrio *et al.* (2002), penurunan bobot badan fetus merupakan bentuk teringan dari ekspresi teratogenik dan merupakan parameter yang lebih sensitif untuk uji teratogenik.

Morfologi Fetus

Pengamatan morfologi fetus yang meliputi kelengkapan dan kelainan pada tungkai depan dan belakang, ekor, telinga, mata, bibir, langit-langit mulut, dan perdarahan bawah kulit (hemoragi), hanya menemukan kelainan berupa hemoragi. Hemoragi tidak ditemukan pada kelompok kontrol, sedangkan pada perlakuan, hemoragi cenderung meningkat seiring dengan peningkatan dosis. Hemoragi yaitu

keluarnya darah dari sistem kardiovaskuler, disertai penimbunan dalam jaringan tubuh (Price dan Wilson, 2005). Hemoragi ditemukan di beberapa lokasi pada tubuh fetus antara lain di daerah kepala, abdomen, dada, punggung, maupun tungkai dan caudal (pangkal ekor). Semakin tinggi dosis ekstrak minyak biji jintan hitam yang diberikan, hemoragi ditemukan semakin banyak, di beberapa lokasi sekaligus pada tubuh bagian luar seekor fetus mencit.

Tabel 4. Bobot dan panjang fetus.

Perlakuan	Jumlah Induk/ N	Fetus	
		Bobot	Panjang
K (Kontrol)	10	34,60 a	34,35 a
Dosis 1	10	24,80 b	26,65 b
Dosis 2	10	16,30 c	14,60 c
Dosis 3	10	6,30 d	6,40 d
Chi Square		32,050	34,000
P Value		0,000	0,000

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$), lambang huruf tidak dibandingkan berdasarkan baris.

Tabel 5. Frekuensi jumlah fetus hemoragi.

Kelompok	Persentase Hemoragi pada Tubuh Fetus					
	Tanpa hemoragi	Hemoragi di 1 lokasi	Hemoragi di 2 lokasi	Hemoragi di 3 lokasi	Hemoragi di 4 lokasi	Hemoragi di 5 lokasi
Kontrol	100%	0	0	0	0	0
Dosis 1	60%	10%	30%	0	0	0
Dosis 2	60%	20%	0	20%	0	0
Dosis 3	0	30%	20%	10%	20%	20%



Gambar 3. Fetus mati, fetus dengan kelainan morfologi (abnormal), dan fetus resorpsi dari kelompok dosis 0,3 ml (D3).

Hemoragi bisa disebabkan oleh berkurangnya jumlah trombosit dalam darah. Beberapa mekanisme penyebab hemoragi lainnya adalah karena vasokonstriksi yang menyebabkan tekanan darah meningkat sehingga pembuluh darah pecah dan akhirnya terjadilah pendarahan. Kenaikan tekanan darah dapat juga distimulasi oleh adanya larutan hipertonik yang sampai ke jaringan fetus yang akhirnya dapat pula menyebabkan pendarahan (Price dan Wilson, 2005). Vasokonstriksi mungkin disebabkan oleh adanya kontraksi otot polos uterus pada masa kebuntingan yang dapat menyebabkan gangguan pada janin. Senyawa aktif dalam ekstrak dimungkinkan dapat memacu kontraksi otot polos uterus. Adanya kontraksi otot polos uterus pada masa kebuntingan dapat menyebabkan gangguan pada janin diantaranya berupa hemoragi. (Widyastuti *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Ekstrak minyak biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang diberikan pada mencit bunting selama organogenesis menurunkan penampilan reproduksi induk dan menyebabkan kelainan fetus berupa hambatan pertumbuhan (fetus berukuran kecil) dan hemoragi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari Dana DIPA BLU Universitas Udayana Tahun Anggaran 2012, untuk itu penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. 2008. Oral and Intraperitoneal LD₅₀ of Thymoquinone, An Active Principle of *Nigella sativa* in Mice and Rats. *Journal of Ayub Medical College* 20(2): 25-7.
- Alenzi FQ, El-Bolkiny YS, Salem ML. 2010. Protective Effects of *Nigella sativa* Oil and Thymoquinone Against Toxicity Induced by The Anticancer Drug Cyclophosphamide, *British Journal of Biomedical Science* 67(1): 20-28.
- Al-Ghamdi MS. 2001. The Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activity of *Nigella sativa*, *Journal of Ethnopharmacology* 76(1):45-48.
- Alhaj NA, Shamsudin MN, Zamri HF, Abdullah R. 2008. Extraction of Essential Oil from *Nigella sativa* Using Supercritical Carbon Dioxide: Study of Antibacterial Activity, *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 3(4): 225-228.
- Ali AB, Ali TH. 2009. Effect of Ultraviolet Ray on The Spermatogenesis and Testes Tissues of Albino Swiss Mice. *Journal of Ecotoxicology* (under review).
- Ali BH, Blunden G. 2008. Pharmacological and Toxicological Properties of *Nigella sativa*, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 21(2):159-171.
- Al-Sa'aidi JAA, ALD Al-Khuzai, NFH Al-Zobaydi. 2009. Effect of Alcoholic Extract of *Nigella sativa* on Fertility in Male Rats, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 23 (II): 123-128.
- Aqel M., Shaheen R. 1996. Effects of The Volatile Oil of *Nigella sativa* Seeds on The Uterine Smooth Muscle of Rat and Guinea Pig, *Journal of Ethnopharmacology* 52(1): 23-26.
- Assayed ME. 2010. Radioprotective Effects of Black Seed (*Nigella sativa*) Oil Against Hemopoietic Damage and Immunosuppression in Gamma-Irradiated Rats. *Immunopharmacology & Immunotoxicology* 32(2):284-296.
- Benhaddou AA, Martineau LC, Vallerand D, Haddad Y, Afshar A, Settaf A, Haddad PS. 2010. Multiple Molecular Targets Underlie The Antidiabetic Effect of *Nigella sativa* Seed Extract in Skeletal Muscle, Adipocyte and Liver Cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12(2): 148-157.
- Boskabady MH, Mohsenpoor N, Takaloo L. 2010. Antiasthmatic Effect of *Nigella sativa* in Airways' Asthmatic Patients. *Phytomedicine* [Epub ahead of print]
- Dehkordi FR, Kamkha AF. 2008. Antihypertensive Effect of *Nigella sativa* Seed Extract in Patients with Mild Hypertension. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 22(4): 447-452.
- EMAP (Edinburgh Mouse Atlas Project). 2009. A 3D Digital Atlas of Mouse Embryonic Development. United Kingdom: University of Edinburg, available at: <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/Atlas/intro.html>
- Isik H, Cevikbaş A, Gürer US, Kiran B, Uresin Y, Rayaman P, Rayaman E, Gürbüz B, Büyükoztürk S. 2010. Potential Adjuvant Effects of *Nigella sativa* Seeds to Improve Specific Immunotherapy in Allergic Rhinitis Patients, *Medical Principles and Practice* 19(3): 206-211.
- Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. 2010. *Nigella sativa* Thymoquinone-Rich Fraction Greatly Improves Plasma Antioxidant Capacity and Expression of Antioxidant Genes in Hypercholesterolemic Rats, *Free Radical Biology and Medicine* 48(5): 664-672.
- Keshri G, Singh MM, Lakshmi V, Kamboj VP. 1995. Post-Coital Contraceptive Efficacy of The Seeds of *Nigella sativa* in Rats, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 39(1): 59-62.
- Lupidi G, Scire A, Camaioni E, Khalife KH, Sanctis DG, Tanfani F, Damiani E. 2010. Thymoquinone-A Potential Therapeutic Agent of *Nigella sativa*, Binds to Site I of Human Serum Albumin. *Phytomedicine* [Epub ahead of print]
- Mohammad A.M., Mohamad MJ, Dradka H. 2009. Effects of Black Seeds (*Nigella sativa*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats, *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 4(2): 386-390.
- Mousavi SH, Tayarani NZ, Asghari M, Sadeghnia HR. 2010. Protective Effect of *Nigella sativa* Extract and Thymoquinone on Serum/Glucose Deprivation-Induced PC₁₂ Cells Death. *Cellular and Molecular Neurobiology* [Epub ahead of print]
- Price S., Wilson. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC, p: 743.

- Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A, Lei DK. 2009. Induction of Apoptosis in HeLa Cells by Chloroform Fraction of Seed Extracts of *Nigella sativa*, *Cancer Cell International* 27: 9-29.
- Terzi A, Coban S, Yildiz F, Ates M, Bitiren M, Taskin A, Aksoy N. 2010. Protective Effects of *Nigella sativa* on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats, *Journal of Investigative Surgery* 23(1): 21-27.
- Yantrio, A., Sugiyanto, J., dan Aida Y. 2002. Efek Klorambusil terhadap Perkembangan Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Strain *Sprague – Dowley*, *Jurnal Biota* VII(3): 101-108.
- Yildiz F, Coban S, Terzi A, Savas M, Bitiren M, Celik H, Aksoy N. 2010. Protective Effects of *Nigella sativa* Against Ischemia-Reperfusion Injury of Kidneys, *Renal Failure* 32(1): 126-131.
- Widyastuti, N. T. Widiyani, dan S. Listyawati. 2006. Efek Teratogenik Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Galur Winstar. *Bioteknologi*. 3 (2): 56-62.
- Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. 2002. Acute and Chronic Toxicity of *Nigella sativa* Fixed Oil, *Phytomedicine* (1): 69-74.