



**SUPLEMENTASI BEKATUL BERAS HITAM UNTUK MENGHAMBAT  
PERKEMBANGAN KANKER KOLON MELALUI PENGHAMBATAN PROLIFERASI  
DAN PENINGKATAN APOPTOSIS PADA MENCIT BALB/C**

Oleh

Yeni Kurniati<sup>1</sup>, Slamet Budijanto<sup>2\*</sup>, Lilis Nuraida<sup>3</sup>, Fitriya Nur Annisa Dewi<sup>4</sup>, Safrida<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Asa Indonesia University, Jl raya kalimalang, East Jakarta, Indonesia 13620

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Bogor Agricultural University, Indonesia 16680

<sup>3</sup>Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, Bogor Agricultural University, Indonesia 16680

<sup>4</sup>Primate Research Center, Bogor Agricultural University, Jalan Lodaya II/5, Bogor, Indonesia 16151

<sup>5</sup>Department of Nutrition, Faculty of Public Health, Universitas Teuku Umar (Jl. Alue Peunyareng, Ujong Tanoh Darat, Meureubo, Aceh Barat, Aceh, Indonesia 23681)

Email: [1yeni.ipbmsi18@gmail.com](mailto:1yeni.ipbmsi18@gmail.com)

**Abstract**

Colon cancer is one of the degenerative diseases caused of death after lung and breast cancer. One of the food ingredients that potentially inhibites the occurrence of colon cancer is black rice bran. The aim of this study was to found the effect of black rice bran on apoptosis and cell proliferation on BALB/c mice. In this study, BALB/c mice were divided into three groups, they are normal group (K-), AOM/DSS induced tumor group (K+), and feeding black rice bran with induction of AOM/DSS (BRB). At the end of the study, all mice were terminated and the presence of nodule were analysed in colon tissue used imageJ application. The expression of caspase-3, caspase-8, and PCNA were analysed in colon tissue used q-RT PCR. The data obtained by analyzes of variance (ANOVA) and continued by Tukey HD different test at 5% level. Administration of BRB significantly decreased the expression of PCNA in comparison with that of control mice (K+) ( $0.58 \pm 0.09$  vs  $5.22 \pm 0.80$ ). The expression of caspase 3 ( $0.91 \pm 0.20$ ) and caspase 8 ( $0.36 \pm 0.15$ ) of BRB significantly increased comparasion with control mice K+. Our results thus indicated that black rice bran performed to suppressed proliferation and induced apoptosis.

**Keywords:** AOM/DSS, BALB/C, Black Rice Bran, Caspase 3, Caspase 8, Colon Cancer, PCNA

**PENDAHULUAN**

*American Cancer Society* [1] melaporkan terdapat 50.260 jiwa mengalami kematian dan 95.520 jiwa terjangkit kanker kolon pada tahun 2017 di Amerika. Hasil penelitian mengenai pengaruh komponen pangan fungsional terhadap pencegahan kanker kolon telah banyak dilaporkan, salah satunya adalah komponen bioaktif seperti senyawa fenol dan serat pangan yang berpotensi sebagai agen

kemopreventif. Beberapa komponen bioaktif pada bekatul beras hitam yang diketahui berperan dalam mencegah terjadinya kanker kolon yaitu asam ferulat, antosianin,  $\gamma$ -oryzanol,  $\beta$ -sitosterol, tokotrienol/tokoferol dan asam fitat [12]. Bekatul beras hitam memiliki kandungan pigmen antosianin dan asam ferulat lebih tinggi dibanding dengan beras merah dan beras putih [11]. Kandungan antosianin yang



merupakan pencetus bioaktivitas penghambat kanker kolon terdapat lebih banyak pada bekatul beras hitam dibanding bekatul beras merah dan beras putih [13]. Antosianin, asam protokatekat, asam ferulat dan  $\gamma$ -oryzanol pada bekatul beras hitam berperan sebagai antioksidan, penekan proliferasi sel kanker, meningkatkan sistem imun dalam jaringan yang terserang kanker, dan penginduksi apoptosis [4]. Selain itu, serat pangan pada bekatul beras hitam diketahui dapat meningkatkan aktivitas enzim caspase, yang merupakan enzim penanda terjadinya apoptosis pada kanker [3].

Selama perkembangan kanker di dalam suatu jaringan, sel akan mengalami mekanisme biokimia yang bertujuan untuk mematikan sel-sel kanker secara terprogram, sehingga dapat menstabilkan populasi sel didalam jaringan. Mekanisme kematian sel secara terprogram pada suatu jaringan tersebut adalah mekanisme apoptosis [19]. Salah satu enzim *caspase* yang berperan dalam proses apoptosis pada kanker kolon adalah *caspase 3* yang berperan sebagai efektor dan *caspase 8* berperan sebagai inisiator. Senyawa bioaktif seperti antosianin, asam ferulat, asam protokatekat pada bekatul beras hitam bertindak sebagai modulator yang dapat mengaktifkan beberapa gen pro-apoptosis, diantaranya yaitu *caspase 3*, *caspase 9*, *caspase 8*, *bcl-2*, dan *bax* [21]. Proliferasi sel kanker kolon dapat dideteksi dengan adanya ekspresi marka *proliferating cell nuclear antigen (pcna)*. *Pcna* merupakan marka proliferasi yang menjadi efektor pada sintesis DNA dan memiliki keterlibatan pada proses replikasi DNA [2]. Komponen bioaktif seperti asam protokatekat dan serat pangan pada bekatul beras hitam diduga memiliki kemampuan untuk menekan proliferasi sel kanker dengan cara menghambat kinerja cyclin dan CDK dalam proses replikasi DNA [20]

Potensi bekatul beras hitam belum pernah diteliti secara mendalam terkait penghambatan kanker kolon. Oleh karena itu, diperlukan suatu studi *in vivo* menggunakan hewan model mencit BALB/c yang diinduksi *Azoxymethane*

(AOM) dan *Dextran sodium sulphate* (DSS) dengan tujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian bekatul beras hitam dalam menghambat perkembangan kanker kolon. Pada studi ini akan dievaluasi kondisi klinis hewan, bobot dan ekspresi gen penanda aktivitas apoptosis dan proliferasi pada organ kolon.

## METODE PENELITIAN

### Persiapan Sampel Bekatul Beras Hitam

Bekatul beras hitam yang digunakan sebagai bahan utama penelitian, diperoleh masih dalam bentuk gabah kering giling (GKG), yang selanjutnya dikupas kulitnya melalui cara penggilingan dengan mesin *huller* merk *Yanmar Rice Huller* tipe HW-60A, sehingga diperoleh beras pecah kulit (PK). Beras PK disosoh dengan mesin *polisher* tipe N-70-F. Dari proses penyosohan akan didapat dua produk, yakni beras sosoh dan bekatul. Selaput bekatul beras hitam diayak dengan ayakan 20 *mesh*. Bekatul beras hitam selanjutnya di keringkan menggunakan mesin *Freeze dry* Labconco pada suhu  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Selanjutnya, bekatul beras hitam di simpan pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Evaluasi Suplementasi Bekatul Beras Hitam terhadap Penghambatan Perkembangan Kanker Kolon pada Mencit BALB/c

Penelitian dilakukan menggunakan 24 ekor mencit. Mencit diadaptasi selama satu minggu kemudian dibagi menjadi tiga kelompok (K+, K-, dan BRB) dengan setiap kelompok terdiri atas delapan ekor mencit. dan ransum diberikan sesuai kebutuhan nutrisi mencit perhari yaitu sebanyak 15 g/100 g berat badan/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Perlakuan pemberian pakan uji dimulai bersamaan dengan induksi menggunakan AOM. Mencit kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (BRB) diinduksi karsinogen secara *intraperitoneal* dengan AOM sebanyak 10 mg/1000 g berat badan mencit pada hari pertama minggu keempat. Seminggu kemudian, mencit pada kelompok



tersebut mendapat perlakuan pemberian DSS melalui air minum (1 % DSS) selama empat hari untuk mempercepat inflamasi. Untuk menyeragamkan tingkat stress, mencit pada kelompok kontrol negatif akan diinduksi oleh 0.9 % NaCl isotonik secara *intraperitoneal* sebagai placebo dan diberi air minum tanpa campuran DSS secara *ad libitum*. Pakan komersil ke pakan standar AIN1993M dilakukan secara bertahap. Selanjutnya mencit diintroduksi dengan pakan uji secara bertahap (disebut sebagai tahap pra-induksi). Jaringan kolon diamati secara makroskopis terhadap adanya nodul. Selanjutnya jaringan difiksasi dengan larutan fiksatif paraformaldehid 4 % untuk kepentingan evaluasi molekuler.

#### Evaluasi Ekspresi Marka Apoptosis dan Prorilferasi

Proses isolasi RNA total diawali dengan menggerus bagian kolon di dalam mortar, kemudian sebanyak 30 mg sampel dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml steril berisi Tryzol. Ekstraksi dilakukan menggunakan *Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus* mengikuti prosedur baku (Zymo Research Mini Handbook 2006). Pengubahan RNA menjadi cDNA dilakukan menggunakan prosedur baku dari SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™ Mini Handbook 2014). Penentuan kuantifikasi relatif ekspresi gen pada Real-time PCR menggunakan *SsoFast™ EvaGreen Supermix*. Selanjutnya, menyiapkan template untuk analisis ekspresi gen *caspase-3 (casp3)*, *caspase-8 (casp8)*, dan *proliferatif cell nuclear antigen (pcna)* dengan mesin *Bio-Rad iQ5 Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories Inc Hercules CA). Kondisi RT-PCR yang digunakan yaitu 42 siklus yang terdiri dari aktivasi enzim pada 98 °C selama 2 menit, denaturasi 98 °C selama 5 detik, dan *annealing* 55 °C selama 10 detik [17].

#### Analisis Data

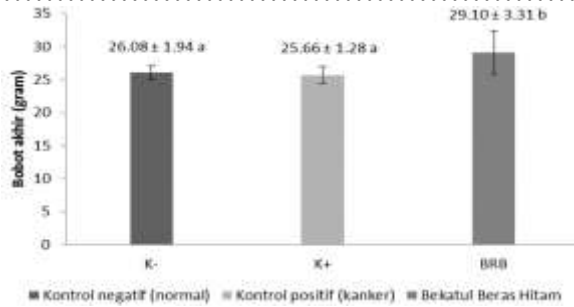
Penelitian dengan delapan kali ulangan, menggunakan rancangan percobaan acak lengkap (RAL) pada tiga perlakuan. Data yang

dilaporkan merupakan rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD). Data hasil percobaan diolah dengan perangkat lunak MiniTab 17.0 dan ditampilkan dalam bentuk Anova satu arah untuk identifikasi perbedaan antar taraf perlakuan. Hasil berbeda antar taraf perlakuan dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey HD dan nilai signifikansi ditentukan berdasarkan taraf nyata 5 %.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

##### Bobot Badan Mencit

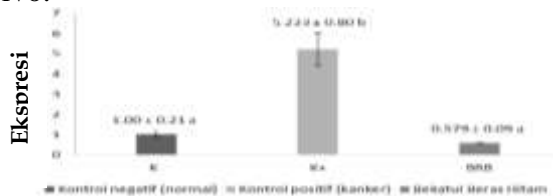
Berdasarkan hasil observasi terhadap kondisi klinis mencit uji, didapatkan bahwa kelompok K-, K+, dan BRB memiliki kondisi klinis dan perilaku yang baik. Hal tersebut ditunjukkan dengan bobot badan yang relatif stabil bahkan terdapat kenaikan bobot badan pada beberapa hewan di kelompok K+ maupun BRB. Rata-rata asupan pakan harian di semua kelompok memenuhi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan yaitu 15 g/100 g berat badan. Hasil analisis terhadap bobot badan mencit menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ ) antara kelompok BRB dengan kelompok K+ dan K-. Kelompok K+ memiliki bobot badan yang cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K- dan BRB, meskipun hanya berbeda nyata dengan Kelompok BRB (Gambar 1). Rendahnya rerata bobot badan pada kelompok tersebut dapat disebabkan oleh adanya efek perkembangan kanker didalam sistem pencernaannya yang mempengaruhi asupan pakannya. Sel-sel tumor juga memerlukan asupan nutrisi yang diperoleh dari inangnya untuk bertahan hidup [18]. Kondisi tumor didalam pencernaan seperti kolon akan menghambat sistem pencernaan nutrisi yang masuk kedalam tubuh, akibatnya bobot badan pada hewan tumor akan mengalami penurunan [14].



Gambar 1 Bobot akhir mencit uji (gram). K- (Kelompok normal + pakan standar) ; K+ (Kelompok kanker + pakan standar) ; dan BRB (Kelompok kanker + pakan modifikasi bekatul beras hitam). Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5 % ( $p < 0.05$ ).

### Ekspresi Marka Proliferasi (*Proliferating cell nuclear antigen/pcna*)

PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) banyak digunakan untuk pendeteksian sel kanker dikarenakan adanya keterlibatan PCNA dengan enzim-enzim dalam proses replikasi DNA, seperti yang telah dilakukan oleh Bravo [2] dimana terdapat suatu aktivitas PCNA selama terjadi replikasi DNA pada fase S dari siklus sel, setelah dilakukan iradiasi ultraviolet dan analisa secara *in vitro* dan *in vivo*.



Gambar 2 Ekspresi mRNA *pcna* pada mencit BALB/c relatif terhadap kelompok K-.

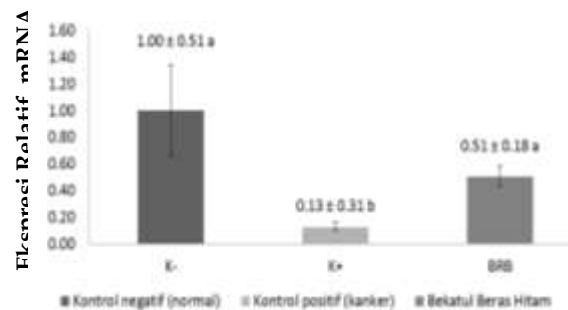
Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5 % ( $p < 0.05$ ).

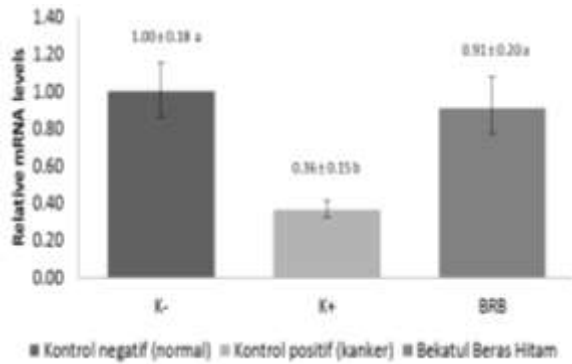
Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok BRB memiliki ekspresi gen *pcna* lebih rendah dibanding dengan kelompok K+ (Gambar 2). Hasil analisis ini menunjukkan bahwa pemberian pakan bekatul beras hitam berpotensi mengendalikan terjadinya

proliferasi sel selama perkembangan kanker. Pakan yang dimodifikasi dengan bekatul beras hitam diduga memiliki kemampuan anti-proliferatif dengan mempengaruhi pembentukan enzim yang berperan dalam proses replikasi dan transkripsi. Hal ini mengakibatkan terhambatnya aktivitas transkripsi pada fase S yang mengarah pada perbaikan siklus sel dan pada akhirnya proliferasi yang berlebihan dapat dikendalikan [7]. Sawitri [18] melaporkan bahwa pemberian ekstrak bekatul beras hitam pada tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi 1,2 DMH mampu menurunkan ekspresi *pcna* sebesar 2,25 fold. Pertumbuhan tumor kolon pada tikus *Sprague-Dawley* yang diberi ekstrak bekatul beras hitam juga menunjukkan rerata yang lebih rendah yaitu 40.44 % dibanding tikus kontrol yang tidak ditreatment dengan bekatul beras hitam sebesar 83.33 %.

Mekanisme penghambatan proliferasi sel kanker oleh senyawa bioaktif yaitu dimulai dari pengikatan atau *blocking area* sisi aktif gen *pcna* oleh senyawa bioaktif dan asam lemak rantai pendek, sehingga laju aktivitas *pcna* pada perkembangan sel kanker akan dihambat dan menurunkan jumlah sel kanker yang terbentuk. Proses pengikatan sisi aktif *pcna* oleh senyawa bioaktif pada bekatul beras hitam akan menghambat aktivitas transkripsi pada fase S yang akan mengarah pada perbaikan DNA yang rusak [7].

### Ekspresi Marka Apoptosis (caspase 3 dan caspase 8)





Gambar 3 (a) Ekspresi mRNA *caspase 3* (b) Ekspresi mRNA *caspase 8*. K- (Kelompok normal + pakan standar) ; K+ (Induksi AOM/DSS + pakan standar) ; dan BRB (Induksi AOM/DSS + pakan modifikasi bekatul beras hitam). Ekspresi merupakan nilai ekspresi relatif terhadap K-. Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5 % ( $p < 0.05$ ).

Proses apoptosis merupakan kematian sel secara terprogram yang normal terjadi untuk menyingkirkan sel-sel yang rusak. Salah satu tipe perubahan biokimia yang terjadi pada apoptosis adalah teraktivasinya caspase [5]. Pada penelitian ini dievaluasi ekspresi gen *caspase 3* (*cas3*) dan *caspase 8* (*cas8*) yang merupakan marka aktifitas apoptosis (Gambar 3). Kelompok BRB menunjukkan ekspresi gen *cas3* dan *cas8* yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok K+. Hal tersebut mengindikasikan bahwa mencit yang diberi pakan bekatul beras hitam berpotensi dalam menekan perkembangan kanker kolon dengan meningkatkan aktifitas apoptosis sel kanker, antara lain dengan mempengaruhi *caspase 3* dan *caspase 8*.

Keberadaan senyawa asam fitat dan asam ferulat pada bekatul beras hitam dilaporkan mampu meningkatkan gen apoptosis seperti *caspase 3* dan menghambat proliferasi tumor pada tikus TRAP [9]. Senyawa asam ferulat dan golongan senyawa fenol lain yang ada pada bekatul beras hitam juga berpotensi menginduksi gen apoptosis seperti *pro-caspase 8*. *Caspase 8* yang merupakan bentuk aktif dari *pro-caspase 8* secara proteolitik akan

mengaktifkan *caspase 3*. Dimana *caspase 3* merupakan gen efektor *caspase* yang dapat merubah morfologis sel seperti fragmentasi DNA, sehingga perkembangan kanker dapat ditekan.

Rosa [15] melaporkan bahwa senyawa fenolik pada bekatul beras hitam dapat mendorong terjadinya apoptosis pada sel kanker yang disebabkan senyawa karsinogen melalui jalur intrinsik (mitokondria). Bekatul beras hitam memiliki jumlah komponen antosianin dan asam ferulat lebih tinggi dibanding bekatul beras merah dan beras putih [11]. Antosianin dan asam ferulat merupakan triger utama yang dimiliki bekatul beras hitam dalam menghambat perkembangan kanker kolon. [6]. Antosianin dan senyawa fenol pada bekatul beras hitam akan mengaktifkan sisi aktif enzim *caspase 8* dan *caspase 3*, sehingga kedua enzim *caspase* tersebut akan aktif dan memulai proses apoptosis melalui jalur intrinsik (mitokondria). Asam butirat yang diproduksi dari proses fermentasi serat pangan larut juga di laporkan dapat menjadi salah satu agen yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker dengan mengaktifkan enzim *caspase 3* dan *caspase 9* [16].

Selain komponen bioaktif, bekatul beras hitam dilaporkan memiliki kandungan serat pangan. Komponen serat pangan berupa  $\beta$ -glukan dilaporkan memiliki efek apoptosis terhadap sel kanker kolon melalui jalur *caspase-3* [8]. Perubahan struktur kromatin tersebut menyebabkan ekspresi protein yang memfasilitasi jalur mitokondria teraktivasi, salah satunya yaitu enzim *caspase-3* [10]. Mekanisme apoptosis pada kanker kolon oleh senyawa bioaktif bekatul beras hitam dapat dijabarkan sebagai berikut yaitu sisi aktif dari senyawa fenol (gugus -OH), antosianin, asam protokatekat, dan asam ferulat yang masuk ke dalam tubuh akan bertindak sebagai modulator pada sel kanker. Secara garis besar, senyawa bioaktif tersebut akan memodulasi ekspresi gen *Fas ligan* dan *Fas* melalui membran sel yang menyebabkan trimerisasi reseptor sebagai awal



.....

proses apoptosis jalur ekstrinsik. Pembentukan trimerisasi reseptor menyebabkan pengikatan antara *FADD* (*Fas associated death domain* protein) dan *death domain*. Pengikatan ini akan mengaktifkan *procaspase-8* sebagai sisi aktif enzim. *Caspase-8* yang teraktivasi oleh *procaspase 8* akan membelah gen *bid* yang merupakan gen pro apoptosis. *Bid* yang terbelah atau biasa disebut *t-Bid* akan ditranslokasikan kedalam mitokondria untuk melepaskan sitokrom-c. Sitokrom-c bersama *Apaf-1* akan mengaktifkan *caspase-9* untuk menginisiasi *caspase 3*. Ketika *caspase 3* teraktivasi maka gen tersebut akan membelah gen *ICAD* (*Caspase-activated-Deoxyribonuklease Inhibitor*) sehingga gen *CAD* (*Caspase-activated-Deoxyribonuklease*) dilepaskan dari *ICAD*. *CAD* mendegradasi kromosom DNA sel kanker, kemudian sel akan mengalami fragmentasi menjadi *apoptotic body* dan terjadi tahap fagositosis (dimana *apoptotic body* mengeluarkan signal “eat me” yang dikenal dengan fagosit misalnya sel makrofag) [5].

## PENUTUP

### KESIMPULAN

Pakan berbasis bekatul beras hitam berpotensi menghambat perkembangan kanker kolon pada mencit BALB/c yang diinduksi dengan AOM/DSS. Pemberian pakan berbasis bekatul beras hitam mampu menekan sebaran tumor pada jaringan kolon dibandingkan perlakuan pakan standar AIN1993M. Komponen serat dan bioaktif pada bekatul beras hitam berpotensi menghambat perkembangan kanker dengan menekan proliferasi sel kanker dengan menurunkan ekspresi gen *pcna* dan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi gen *caspase 3* dan *caspase 8*. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa bekatul beras hitam berpotensi dalam menghambat perkembangan kanker pada kolon. Bekatul beras hitam dapat dijadikan makanan terapi atau asupan

pendamping pada penderita kanker kolon (namun diperlukan penelitian lebih lanjut).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bpk Prof Dr Ir Slamet Budijanto, MAgr, Ibu Prof Dr Ir Lilis Nuraida, MSc dan Ibu Drh Fitriya Nur Annisa Dewi PhD selaku pembimbing. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Ristek DIKTI pada program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi atas pendanaan yang diberikan. Terima kasih kepada teman seperjuangan penelitian Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, suami, anak-anak serta seluruh keluarga, atas segala doa dan kasih sayangnya.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] [ACS] American Cancer Society. 2017. Cancer Facts and Figures in 2017. Association Cancer Society. Inc. Surveillance Research.
- [2] Bravo R, Donald BH. 1987. Existence of two populations of cyclin proliferating cell nuclear antigen during the cell-cycle-association with DNA-replication sites. *Journal Cell Biology*. 105: 1549-1554.
- [3] Foitzik A, Preckel H, Mumtsidu. 2009. Image-based quantification of apoptosis by caspase-3 activation. Application Note. Hamburg, DE: Biological Application PerkinElmer, Cellular Technologies, Germany GmbH Bio-discovery.
- [4] Forster GM, Raina K, Kumar A, Kumar S, Agarwal R, Chen MH, Bauer JE, McClung AM, Ryan EP. 2013. Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth. *Journal Food Chemistry*. 141: 1545-1552.
- [5] Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda A, Wiechec E, Halayko AJ, Los M. 2009. Apoptosis and cancer:



- mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics* 46: 497-510.
- [6] Glasauer A, Chandel NS. 2014. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 7:1-12.
- [7] Kim HY, Kim JH, Yang SB, Hong SG, Lee SA, Hwang SJ, Shin KS, Suh HJ, Park MH. 2007. A polysaccharide extracted from rice bran fermented with *Lentinus edodes* enhances natural killer cell activity and exhibits anticancer effects. *Journal of Medicine Food*. 10:25-31.
- [8] Kim MJ, Hong SY, Kim SK, Cheong C, Park HJ, Chun HK, Jang Kh, Yoon BD, Kim CH, Kang SA. 2009.  $\beta$ -glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. *Nutrition Research and Practice*. 3(3): 180-184.
- [9] Kuno T, Hirose Y, Hata K, Kato K, Qiang SH, Kitaori N, Hara A, Iwasaki T, Yoshimura T, Wada K. 2006. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran against Prostate Carcinogenesis in TRAP Rats. *International Journal of Oncology*. 25:1809-15.
- [10] Medina V, Edmonds B, Young GP. 1997. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Journal of Cancer*. 57: 3697-3707.
- [11] Moongnarm A, Daomukda N, Khumpika S. 2012. Chemical compositions, phytochemical, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *APCBEC Procedia*. Vol. 2:73-79.
- [12] Norazalina S, Norhaizan ME, Hairuszah I, Norashareena MS. 2010. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Toxicology Pathology*. 62:259-68.
- [13] Pengkumsri N, Chaiyasut C, Saenjum C, Sirilun S, Peerajan S, Suwannalert P, Sirisattha S, Sivamaruthi Bs. 2015. Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. *Food Science Technology*. 35 (2): 331-338.
- [14] Phutthaphadoong S, Yamada Y, Hirata A, Tomita H, Hara A, Limtrakul P, Iwasaki T, Kobayashi H, Mori H. 2010. Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran (FBRA) on the inflammation-related colorectal carcinogenesis in *ApcMin/+* mice. *International Journal of Oncology*. 23:53-9.
- [15] Rosa LS, Silva NJA, Soares NCP, Monteiro MC, Teodoro AJ. 2016. Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer – a review. *Journal of Nutrition Food Science*. 6(2):1-7.
- [16] Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dione S, Levy E, Lentze MJ. 2003. Butyrate induced *cac-2* cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Journal of cancer*. 52:94-100.
- [17] Sahai, Veena. 2015. Effect of fluoridation on caspase-3 protein forming gene in swiss albino mice. *Journal Of Zoology*. 04 : 13-18.
- [18] Sawitri Endang, Riwanto I, Tjahjono, dan Darmana Edi. 2012. Ekstrak bekatul hitam, pertumbuhan tumor dan proliferasi sel kanker kolorektal : studi eksperimental pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi 1,2 DMH. *Jurnal Medika Media Indonesia*. Vol 46, nomor 01, hal : 25-32.
- [19] Shi Y. 2002. Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* . 9:459-470.
- [20] Yi W, Fischer J, Krewer G, and Akoh CC. 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell



- .....
- proliferation and induce apoptosis.  
Journal. Agriculture. Food Chemistry. 53,  
7320 -7329
- [21] Yin MC, Lin CC, Wu HC, Tsao SM, Hsu  
CK. 2009. Apoptotic effect of  
protocatechuic acid in human breast,  
lung ,iver, cervix, and prostate cancer  
cell : potential mechanisms of action.  
Journal Agriculture Food Chemistry. 57 :  
6468-6473.