





Open access article


## STUDI BIOINFORMATIKA TANAMAN GENUS NIGELLA TERHADAP KANKER PAYUDARA TIPE BASAL BERBASIS TRANSKRIPTOMIK DAN FARMAKOLOGI JARINGAN

*A Multi-Target Bioinformatics Analysis of the Nigella Genus Against Basal-Type Breast Cancer: An Integrative Transcriptomic and Network Pharmacology Approach*

Penulis / Author (s)

Saipul Maulana<sup>1</sup> <sup>1</sup> Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia.

Muhammad Sulaiman Zubair<sup>1</sup> 

Muh. Azwar AR<sup>1</sup> 

Koresponden : Saipul Maulana<sup>1</sup> 

e-mail korespondensi: [saifulmaulana011@gmail.com](mailto:saifulmaulana011@gmail.com)

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v22i1.2038>

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

**Keywords:**

EGFR;  
Network Pharmacology;  
Basal-Type Breast Cancer;  
Nigella Genus;  
TNBC;

**Kata Kunci**

EGFR;  
Farmakologi Jaringan;  
Kanker Payudara Tipe Basal;  
Nigella genus;  
TNBC;

Basal-type breast cancer (Triple-Negative Breast Cancer, TNBC) is an aggressive subtype characterized by poor prognosis and limited conventional therapeutic options due to the absence of hormone receptor and HER2 expressions. To address this challenge, this study aims to elucidate the molecular mechanisms of compounds derived from the Nigella genus against basal-type breast cancer using a Network Pharmacology approach integrated with transcriptomic data. This in silico experimental study began with the identification of 433 bioactive compounds from the Nigella genus retrieved from databases, which were predicted to target a total of 2,227 potential proteins. Transcriptomic analysis was performed using the GSE7904 dataset, comparing 18 basal-type breast cancer samples with 7 normal control samples. Statistical analysis identified 4,901 significantly Differentially Expressed Genes (DEGs). Venn diagram intersection analysis between the compound targets and DEGs revealed 996 overlapping genes, which were designated as potential candidate targets. Protein-Protein Interaction (PPI) network topology analysis identified EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) as the top hub protein with a degree value of 110, followed by SRC (108) and PIK3CA (70). Functional enrichment analysis (KEGG) validated EGFR as a critical receptor in TNBC, initiating oncogenic signaling pathways such as MAPK and PI3K-Akt that drive basal-type cancer cell proliferation. Bioactive compounds from Nigella were predicted to exert their effects by interacting with membrane receptors and inhibiting tyrosine kinase activity. Therapeutic intervention targeting EGFR using bioactive compounds from the Nigella genus therefore represents a promising strategy to overcome resistance and aggressiveness in basal-type breast cancer.

Kanker payudara tipe basal (*Triple-Negative Breast Cancer/TNBC*) merupakan sub tipe agresif yang ditandai dengan prognosis buruk dan terbatasnya pilihan terapi konvensional akibat ketiadaan ekspresi reseptor hormon dan HER2. Untuk mengatasi tantangan ini, penelitian ini bertujuan menjelaskan mekanisme molekuler senyawa genus *Nigella* terhadap kanker payudara tipe basal menggunakan pendekatan Farmakologi Jaringan (*Network Pharmacology*) terintegrasi dengan data transkriptomik. Studi eksperimental *in silico* ini diawali dengan mengidentifikasi 433 senyawa bioaktif genus *Nigella* dari basis data, yang memprediksi total 2.227 target protein potensial. Analisis transkriptomik dilakukan pada dataset GSE7904, yang membandingkan 18 sampel kanker basal dengan 7 kontrol normal. Berdasarkan uji statistik, analisis ini berhasil mengidentifikasi total 4.901 *Differentially Expressed Genes* (DEGs) signifikan. Melalui analisis irisan diagram Venn antara kedua dataset, ditemukan 996 gen tumpang tindih yang ditetapkan sebagai target kandidat potensial. Analisis topologi jaringan Interaksi Protein-Protein (PPI) mengidentifikasi EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) sebagai protein kunci (*hub gene*) teratas dengan nilai derajat (*degree*) 110, diikuti oleh SRC (108) dan PIK3CA (70). Analisis fungsional (KEGG) memvalidasi bahwa EGFR merupakan reseptor esensial dalam TNBC, yang menginisiasi jalur sinyal onkogenik MAPK dan PI3K-Akt yang mendorong proliferasi sel kanker tipe basal. Senyawa bioaktif *Nigella* diprediksi bekerja dengan berinteraksi pada reseptor membran dan menghambat aktivitas tirosin kinase. Intervensi terapeutik yang menargetkan EGFR menggunakan senyawa bioaktif genus *Nigella* menjadi strategi pengobatan yang menjanjikan untuk mengatasi resistensi dan agresivitas kanker payudara tipe basal.

## PENDAHULUAN

Kanker menjadi salah satu permasalahan kesehatan global dengan insidensi, mortalitas, serta kompleksitas biologis yang melibatkan proliferasi sel yang tak terkendali, resistensi apoptosis, angiogenesis, dan metastasis (1). Terapi konvensional sering terhambat oleh toksisitas sistemik, *multidrug resistance* (MDR), dan tingginya angka kekambuhan, sehingga memunculkan kebutuhan strategi terapeutik yang mampu menargetkan berbagai nodus biologis secara simultan (2-4). Dalam mengatasi masalah ini pendekatan *Network Pharmacology* (NP) atau farmakologi jaringan berbasis sistem mampu memetakan interaksi senyawa target dan jalur mekanisme molekuler secara komprehensif. Integrasi NP dengan data transkriptomik pasien, seperti GEO, meningkatkan kemampuan dalam mengidentifikasi hub genes, jalur pensinyalan kritis, serta mekanisme sinergis kandidat fitofarmaka, menjadikannya pendekatan relevan untuk mengatasi kompleksnya jaringan biologis kanker (5).

Pada penelitian ini, genus *Nigella* (Ranunculaceae) dipilih sebagai salah satu sumber fitokimia multi-komponen yang telah lama digunakan secara tradisional di wilayah Mediterania, Asia Barat, dan Afrika Utara (6). Spesies utama seperti *N. sativa*, *N. damascena*,

*N. arvensis*, dan beberapa taksa endemik di Turki menunjukkan diversitas fitometabolit yang luas (6-8). *Nigella sativa* secara khusus menjadi fokus penelitian karena kandungan thymoquinone (TQ), yang mencapai 27,8-57,0% dalam minyak atsirinya, bersama dithymoquinone (nigellone), thymol, dan  $\alpha$ -hederin yang berkontribusi pada aktivitas farmakologisnya (7). Kajian farmakologi modern menunjukkan bahwa TQ memiliki efek pro-apoptotik, anti-inflamasi, anti-proliferasi, serta anti-metastasis yang kuat, menjadikannya kandidat antikanker dengan profil multi-target yang unik (1,9,10). Sifat multi-komponen dan multi-jalur ini selaras dengan prinsip NP, memperkuat relevansi *Nigella* sebagai matriks fitokimia yang cocok untuk pendekatan polifarmakologi.

Secara molekuler, TQ dan derivatif *Nigella* memodulasi berbagai mekanisme inti keganasan. TQ menginduksi apoptosis melalui peningkatan ROS, aktivasi jalur mitokondria, peningkatan BAX, serta penurunan Bcl-2 dan Bcl-xL, termasuk aktivasi kaspase pada sel leukemia HL-60. TQ juga menahan siklus sel pada fase G1 atau G2/M melalui regulasi p21/p27, cyclin D/E, dan cyclin B1 (4). Selain itu, TQ menekan jalur PI3K/AKT/mTOR melalui peningkatan PTEN (4), menghambat NF- $\kappa$ B (11,12), memblokir

STAT3 melalui inaktivasi fosforilasi EGFR (12), serta mengganggu Wnt/ $\beta$ -catenin melalui aktivasi GSK-3 $\beta$  (8). Aktivitas antiangiogenesis turut terkonfirmasi melalui penurunan VEGF dan HGF $\beta$  pada model HCC (13). Pada kanker payudara *triple-negative* (TNBC), TQ menghambat EMT melalui supresi TWIST1 dan ZEB1, dan menunjukkan sinergi kuat dengan miR-34a (14) yang relevan dengan heterogenitas biologis TNBC yang terdiri atas sub tipe BL1/BL2 yang sensitif terhadap platinum (2,15).

Selain efek langsung terhadap pensinyalan seluler, *Nigella* memperlihatkan peran epigenetik yang penting. TQ menghambat DNMT1 melalui gangguan kompleks Sp1/NF- $\kappa$ B yang menyebabkan hipometilasi DNA global serta reaktivasi gen supresor tumor seperti miR-29b (16). Disisi lain, inhibisi HDAC3 memperkuat fungsi TQ sebagai agen epigenetik alami yang memengaruhi remodelasi kromatin. Lebih lanjut, kombinasi TQ dengan 5-fluorourasil dan koenzim Q10 menghasilkan peningkatan potensi antikanker melalui modulasi PI3K/AKT/mTOR dan peningkatan stres oksidatif (17). Validasi *in silico* berbasis NP dan molecular docking mengidentifikasi senyawa *Nigella* lain seperti gramisterol dan cycloeucaenol yang memiliki afinitas tinggi terhadap berbagai gen pada kanker kulit, termasuk EGFR, MAPK1, MAPK3, CDK4, dan AR (18), mengonfirmasi spektrum multi-target *Nigella* lintas tipe kanker.

Berbagai penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa genus *Nigella* memiliki potensi ilmiah dan terapeutik yang signifikan sebagai sumber senyawa antikanker multi-target, khususnya dalam konteks penyakit kompleks seperti kanker payudara. Namun demikian, meskipun sifat multi-komponen dan multi-jalur *Nigella* telah banyak dilaporkan, integrasi sistematis antara profil fitokimia *Nigella*, data transkriptomik pasien kanker payudara tipe basal (Triple-Negative Breast Cancer/TNBC), serta pendekatan *network pharmacology* masih terbatas dalam literatur. Keterbatasan ini terutama terlihat dalam upaya mengidentifikasi target molekuler kunci (*hub genes*) dan jalur pensinyalan utama yang berperan dalam agresivitas dan progresivitas TNBC.

Kondisi tersebut menegaskan urgensi dilakukannya penelitian lanjutan yang memadukan pendekatan komputasional berbasis *network pharmacology* dengan analisis data transkriptomik untuk memetakan hubungan senyawa target-jalur mekanisme molekuler secara lebih komprehensif dan presisi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji mekanisme molekuler multitarget senyawa bioaktif dari genus *Nigella* terhadap

kanker payudara tipe basal melalui integrasi *network pharmacology* dan data transkriptomik, guna mengidentifikasi gen target potensial, *hub genes*, serta jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam patogenesis TNBC. Pendekatan ini diharapkan dapat membuka peluang inovasi pengembangan strategi terapi antikanker berbasis fitofarmaka multi-target yang lebih efektif, aman, dan selaras dengan prinsip pengobatan presisi.

## METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in silico* yang menggunakan pendekatan terpadu antara farmakologi jaringan (*network pharmacology*) dan analisis transkriptomik.

### Identifikasi Senyawa *Nigella sativa* dan Prediksi Target Protein

Senyawa bioaktif dari genus *Nigella* dikumpulkan melalui penelusuran pada database KNApSAcK

(<http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/>) dan IMPPAT (*Indian Medicinal Plants, Phytochemistry And Therapeutics*) (<https://cb.imsc.res.in/imppat/>). Spesies yang teridentifikasi dalam database tersebut meliputi *Nigella arvensis*, *Nigella damascena* L., *Nigella glandulifera*, *Nigella glandulifera* Freyn et Sint., dan *Nigella sativa*. Struktur kimia dari senyawa yang diperoleh kemudian dikonversi ke dalam format *Simplified Molecular-Input Line-Entry System* (SMILES). Selanjutnya, untuk memprediksi target protein potensial dari senyawa-senyawa tersebut, format SMILES diunggah ke dua platform yaitu TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/>) dan *Similarity Ensemble Approach* (SEA) (<http://sea.bkslab.org/>). Seluruh target yang terprediksi dari kedua server tersebut dikompilasi dan dianalisis untuk mengurangi resiko duplikasi pada tahap selanjutnya.

### Analisis Transkriptomik dan Identifikasi Gen Diferensial

Data profil ekspresi gen kanker payudara diperoleh dari *NCBI Gene Expression Omnibus* (GEO) dengan kode akses GSE7904. Dataset ini terdiri dari total 25 sampel, yang mencakup 7 sampel jaringan payudara normal dan 18 sampel sel kanker payudara tipe *basal-like*. Analisis diferensial ekspresi gen dilakukan menggunakan platform GEO2R menggunakan paket Limma. Data dievaluasi dengan transformasi  $\log_2$  secara otomatis dan dilakukan normalisasi untuk mengurangi variasi teknis antar sampel. Koreksi terhadap *multiple testing* dilakukan menggunakan metode Benjamini-Hochberg untuk mengontrol *false discovery rate* (FDR).

Gen yang diekspresikan secara diferensial (*Differentially Expressed Genes/DEGs*) ditentukan berdasarkan kriteria *adjusted p-value* (FDR) < 0,05 dan nilai  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ . Visualisasi hasil analisis dilakukan menggunakan Volcano Plot untuk menggambarkan distribusi gen yang mengalami upregulation dan downregulation.

### Identifikasi Target Potensial Melalui Analisis Irisan

Penentuan target gen terapeutik spesifik dari genus *Nigella* terhadap kanker payudara tipe basal, dilakukan dengan membuat irisan (*intersection*) antara dataset target prediksi senyawa (dari tahap 1) dan dataset DEGs (dari tahap 2). Gen-gen yang ditemukan beririsan di antara kedua dataset tersebut dipetakan menggunakan diagram Venn melalui Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Gen-gen hasil irisan ini dianggap sebagai *Gene of Interest* (GoI) atau target potensial utama, karena mewakili protein yang tidak hanya dapat diikat oleh senyawa aktif *Nigella sativa*, tetapi juga mengalami perubahan ekspresi yang signifikan pada kondisi patologis kanker tersebut.

### Konstruksi Jaringan Interaksi Protein (PPI) dan Analisis Pengayaan

Prediksi target protein dari senyawa bioaktif genus *Nigella* dilakukan menggunakan dua pendekatan berbasis struktur, yaitu TargetNet dan Similarity Ensemble Approach (SEA). Pada TargetNet, hanya target dengan nilai probabilitas  $\geq 0,5$  yang dipertimbangkan, sedangkan pada SEA digunakan ambang batas nilai E-value  $\leq 1^{-10}$  untuk memastikan gen yang prediksi adalah signifikan pada Kanker Payudara tipe Basal. Seluruh target yang diperoleh dibatasi pada protein manusia (*Homo sapiens*) untuk menjaga relevansi biologis terhadap kanker payudara. Hasil prediksi dari kedua platform kemudian digabungkan dan dilakukan proses penghapusan duplikasi berdasarkan kesamaan nama gen/protein untuk menghasilkan daftar target unik. Interaksi antar protein dari gen hasil irisan dipetakan ke dalam jaringan Protein-Protein Interaction (PPI) menggunakan database STRING. Hanya interaksi dengan skor kepercayaan tinggi (*confidence score*  $\geq 0,700$ ) yang dimasukkan ke dalam jaringan. Visualisasi dan analisis topologi jaringan dilakukan menggunakan Cytoscape (versi 3.9.1), dengan identifikasi hub protein berdasarkan parameter degree centrality. Selanjutnya, analisis pengayaan fungsional dilakukan menggunakan DAVID untuk mengevaluasi Gene Ontology (GO) dan jalur KEGG pathways.

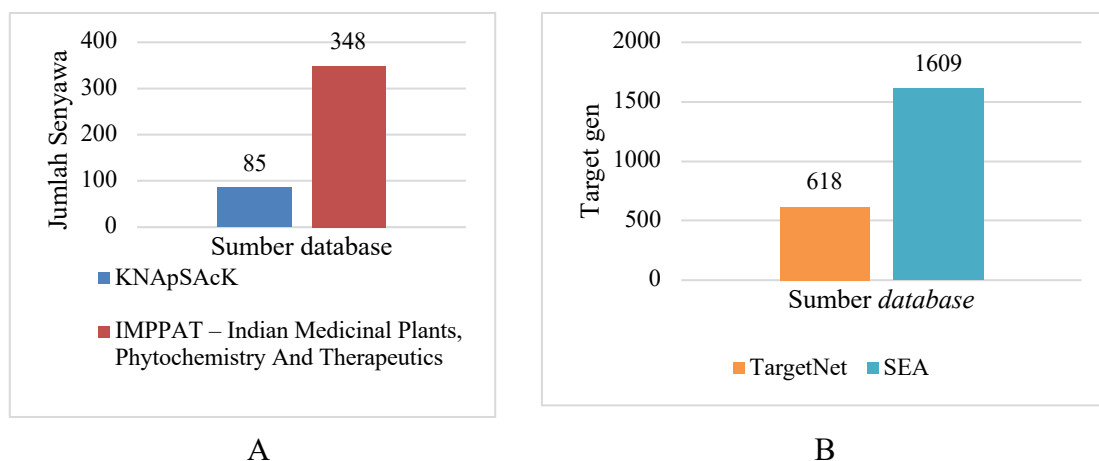
### Validasi Analisis Survival

Analisis survival dilakukan untuk mengevaluasi hubungan antara ekspresi gen dengan prognosis pasien kanker payudara menggunakan platform Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>), berdasarkan data ekspresi gen dan informasi klinis dari dataset publik tervalidasi meliputi *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) dan *Gene Expression Omnibus* (GEO) sebagai bentuk validasi eksternal. Gen yang dianalisis dalam analisis survival meliputi gen dengan peringkat teratas yang dipilih berdasarkan nilai centrality tertinggi dalam jaringan protein-protein interaction (PPI). Analisis dilakukan menggunakan data ekspresi mRNA berbasis *microarray* dengan pemilihan probe spesifik untuk masing-masing gen. Gen terpilih dibagi menjadi dua kelompok pada pasien dengan ekspresi gen tinggi dan rendah menggunakan parameter *auto-selected best cutoff* berbasis persentil. Parameter prognosis yang dievaluasi adalah *Relapse-Free Survival* (RFS) dengan waktu follow-up tanpa batas (*all*) serta penerapan *censoring*. Data selanjutnya difiltrasi untuk menjamin kualitas data dengan menghapus sampel gen terduplikasi. Analisis difokuskan pada sel kanker payudara subtype basal (PAM50) yang merepresentasikan fenotip *Triple-Negative Breast Cancer* (TNBC). Nilai *hazard ratio* (HR) pada interval kepercayaan 95% dan *log-rank p-value* (< 0,05) digunakan untuk menilai signifikansi hubungan antara ekspresi gen dan survival pasien.

## HASIL

### Identifikasi Senyawa Aktif dan Prediksi Target

Eksplorasi senyawa bioaktif pada genus *Nigella* dilakukan melalui penelusuran basis data KNApSACk dan IMPPAT (*Indian Medicinal Plants, Phytochemistry And Therapeutics*). Berdasarkan hasil penapisan awal, teridentifikasi total 433 entri senyawa, dengan distribusi 85 senyawa diperoleh dari KNApSACk dan 348 senyawa dari IMPPAT (Gambar 1 A). Struktur kimia dari seluruh senyawa tersebut dikurasi dan diproses untuk prediksi target molekuler menggunakan platform TargetNet dan *Similarity Ensemble Approach* (SEA), diperoleh total 2227 target protein potensial (Gambar 1 B). Daftar lengkap senyawa hasil penelusuran serta gen target yang teridentifikasi disajikan dalam Data Tambahan (*Supplementary File*). Banyaknya senyawa dan target yang teridentifikasi mengindikasikan bahwa genus *Nigella* memiliki konstituen multikomponen dengan spektrum aktivitas biologis yang luas.

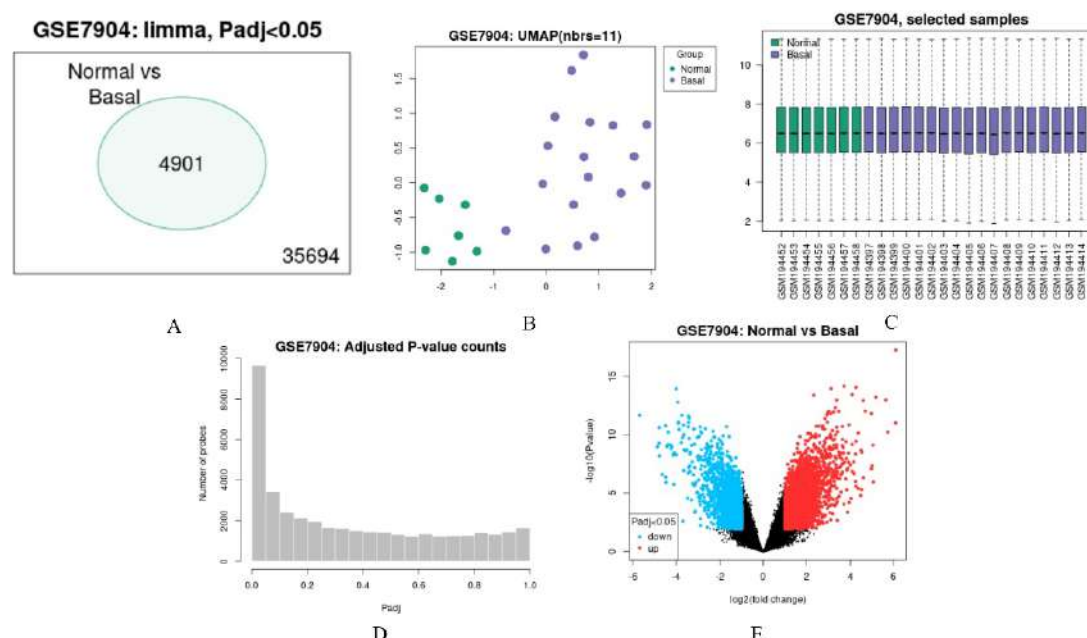


**Gambar 1.** Distribusi jumlah senyawa bioaktif genus *Nigella* yang teridentifikasi dari basis data KNApSAcK dan IMPPAT.

Analisis transkriptomik dilakukan pada dataset GSE7904 untuk membandingkan profil ekspresi gen antara 18 sampel kanker payudara tipe basal dan 7 kontrol normal. Sebelum penentuan gen diferensial, validasi kualitas data dilakukan untuk memastikan reliabilitas analisis. Sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2 C, plot normalisasi memperlihatkan distribusi intensitas sinyal yang setara dengan nilai median yang sejajar antar seluruh sampel, mengindikasikan bahwa variasi teknis telah berhasil diminimalisir. Hal ini didukung oleh analisis reduksi dimensi UMAP pada Gambar 2 B, yang menunjukkan segregasi kluster yang tegas antara kelompok normal (titik hijau) dan kanker (titik ungu). Pemisahan yang jelas ini mengonfirmasi bahwa perbedaan profil genetik antar kelompok bersifat biologis dan bukan akibat kesalahan klasifikasi sampel.

Berdasarkan analisis diferensial ekspresi gen menggunakan metode Limma dengan kriteria adjusted p-value (FDR) < 0,05 dan  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ , teridentifikasi sejumlah gen yang mengalami perubahan ekspresi signifikan.

Histogram distribusi p-value (Gambar 2D) menunjukkan akumulasi frekuensi tinggi pada nilai mendekati nol, yang mengindikasikan adanya sinyal biologis yang kuat antara kelompok sampel. Secara keseluruhan, analisis ini mengidentifikasi sebanyak 4901 *Differentially Expressed Genes* (DEGs) yang signifikan secara statistik (Gambar 2A). Penerapan cutoff  $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$  memastikan bahwa gen yang terpilih tidak hanya signifikan secara statistik, tetapi juga memiliki perubahan ekspresi yang bermakna secara biologis. Visualisasi menggunakan Volcano Plot (Gambar 2E) menunjukkan bahwa dari total DEGs tersebut, sebanyak 2891 gen mengalami *upregulation* (ditandai dengan titik merah yang menyebar ke sisi kanan) dan 2010 gen mengalami *downregulation* (titik biru di sisi kiri) (File suplemen). Distribusi gen pada plot menunjukkan pola pemisahan yang jelas antara gen yang mengalami peningkatan dan penurunan ekspresi pada kanker payudara tipe basal dibandingkan jaringan normal.



**Gambar 2.** Analisis profil ekspresi gen pada dataset GSE7904. (A) Jumlah total DEGs; (B) Plot UMAP kluster sampel; (C) Normalisasi data; (D) Histogram p-value; dan (E) Volcano plot sebaran gen ter-upregulation (merah) dan downregulation (biru).

Penentuan gen target terapeutik spesifik dari genus *Nigella* yang berperan dalam patogenesis kanker payudara tipe basal dilakukan berdasarkan hasil analisis irisan diagram Venn. Penandingan antara dataset target prediksi senyawa *Nigella* dan dataset gen diferensial (DEGs) menghasilkan himpunan data yang terdiri dari 996 gen tumpang tindih (Gambar 3). Gen-gen ini selanjutnya ditetapkan sebagai target kandidat potensial (*common targets*) karena memiliki validitas ganda: secara farmakologis dapat diintervensi oleh senyawa *Nigella*, dan secara klinis relevan dengan profil penyakit kanker payudara.

Interaksi antar protein dari gen kandidat tersebut dipetakan ke dalam jaringan Interaksi Protein-Protein (PPI). Kompleksitas jaringan yang terbentuk kemudian dilanjutkan pada analisis modular untuk mengidentifikasi kluster protein yang memiliki fungsi biologis yang rapat. Berdasarkan algoritma klusterisasi, diperoleh 29 kluster fungsional yang signifikan ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Tahap seleksi selanjutnya difokuskan pada relevansi patologis, di mana Kluster 3 terpilih sebagai kelompok utama untuk analisis lebih

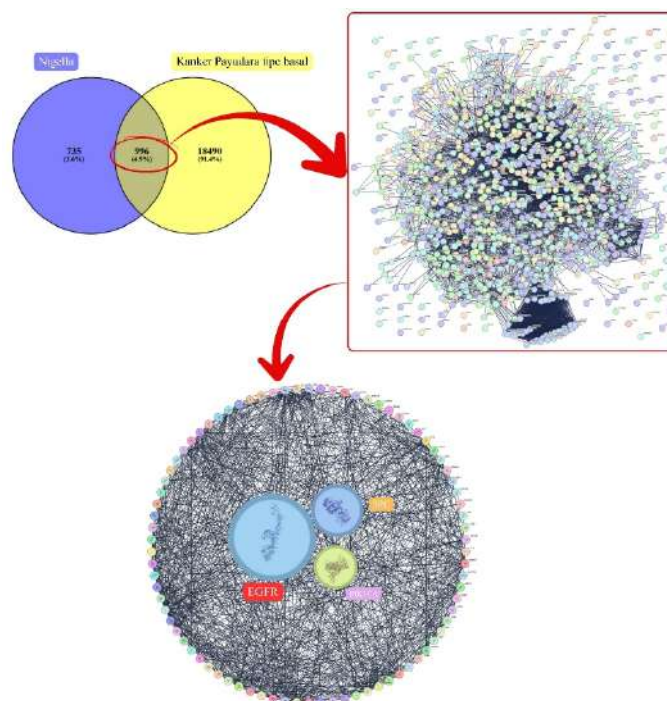
lanjut. Pemilihan ini didasarkan pada hasil pengayaan fungsi yang menunjukkan bahwa kluster ini hubungan yang kuat dengan jalur sinyal kanker payudara. Kluster 3 terdiri dari 85 gen yang membentuk sub-jaringan padat dan saling terhubung.

Analisis topologi mendalam dilakukan pada 85 gen dalam Kluster 3 untuk menentukan protein kunci (*hub genes*) berdasarkan parameter *Degree*, *Closeness Centrality*, dan *Betweenness Centrality*. Sebagaimana disajikan pada Tabel 1 (Selengkapnya pada *Supplementary file*), teridentifikasi 10 gen peringkat teratas dengan nilai konektivitas tertinggi. EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) menempati peringkat pertama dengan derajat (*degree*) 110, diikuti oleh SRC (108) dan PIK3CA (70). Tingginya nilai sentralitas pada gen-gen ini, seperti *GRB2*, *JAK2*, dan *STAT1*, mengindikasikan bahwa mereka berfungsi sebagai "titik komunikasi utama" yang vital dalam jaringan. Penghambatan pada protein-protein *hub* ini diprediksi akan memberikan dampak sistemik yang signifikan dalam meruntuhkan stabilitas jaringan kanker payudara tipe basal.

Tabel 1. Daftar *Hub Genes* Teratas Berdasarkan Analisis Topologi pada Kluster 3

No.	Gen	Degree	Closeness centrality	Betweenness centrality
1	EGFR	110	0.422	0.047
2	SRC	108	0.421	0.044
3	PIK3CA	70	0.378	0.007

4	PIK3R1	67	0.373	0.007
5	GRB2	66	0.370	0.013
6	CD4	65	0.371	0.012
7	JAK2	62	0.371	0.018
8	ERBB2	62	0.384	0.012
9	STAT1	59	0.379	0.007
10	FYN	54	0.374	0.010



**Gambar 3.** Identifikasi target potensial dan analisis jaringan. Diagram Venn menunjukkan 996 gen irisan antara target genus *Nigella* dan gen kanker payudara tipe basal. Visualisasi jaringan PPI menunjukkan protein *hub* utama (EGFR, SRC, PIK3CA).

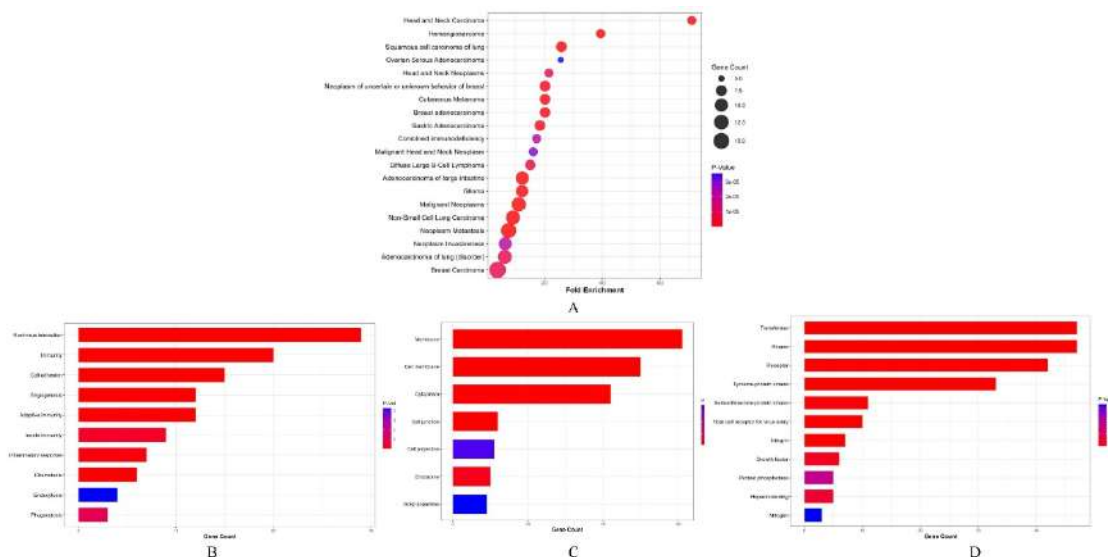
Validasi relevansi klinis dari kluster gen terpilih dan penentuan mekanisme molekuler genus *Nigella* dalam menghambat kanker payudara, dilakukan melalui analisis pengayaan fungsional (*enrichment*). Langkah awal difokuskan pada pemetaan hubungan jalur penyakit menggunakan basis data DisGeNET (Gambar 4 A). Hasil analisis menunjukkan bahwa 85 gen target dalam kluster tersebut memiliki pengayaan yang sangat signifikan terhadap berbagai terminologi kanker. Secara spesifik, gen-gen ini sangat berkorelasi dengan "*Breast Adenocarcinoma*", "*Breast Carcinoma*", serta kondisi patologis lanjut seperti "*Neoplasm Metastasis*" dan "*Neoplasm Invasiveness*". Temuan ini mengonfirmasi bahwa target molekuler yang dimodulasi oleh senyawa *Nigella* memang memiliki peran penting dalam perkembangan dan penyebaran kanker payudara, khususnya pada subtype yang agresif.

Selanjutnya, analisis *Gene Ontology* (GO) pada kategori Proses Biologis (BP) mengungkapkan mekanisme aksi yang potensial (Gambar 4 B). Target-target tersebut secara predominan terlibat dalam regulasi sistem imun, ditandai dengan tingginya pengayaan pada istilah "*Immunity*", "*Adaptive Immunity*", dan "*Innate Immunity*". Selain modulasi imun, *Nigella* juga diprediksi menghambat progresi tumor melalui mekanisme anti-angiogenesis dan anti-metastasis, yang tercermin dari signifikansi pada terminologi "*Angiogenesis*" dan "*Cell adhesion*". Hal ini mengindikasikan bahwa genus *Nigella* tidak hanya berpotensi membunuh sel kanker secara langsung, tetapi juga memodifikasi lingkungan mikro tumor (*tumor microenvironment*) dengan menghambat pembentukan pembuluh darah baru dan perlekatan sel. Ditinjau dari lokasi subseluler atau Komponen Seluler (CC), mayoritas protein

target terdistribusi pada area "Membrane", "Cell membrane", dan "Cytoplasm" (Gambar 4 C). Lokasi ini konsisten dengan fungsi molekuler (MF) yang teridentifikasi pada Gambar 4 D, di mana aktivitas molekuler yang paling dominan adalah sebagai "Kinase", "Receptor", dan "Tyrosine-protein kinase".

Integrasi data GO ini memberikan gambaran mekanisme yang lengkap yaitu senyawa bioaktif

dari genus *Nigella* diprediksi berinteraksi dengan reseptor membran (seperti EGFR yang teridentifikasi sebagai *hub gene*) dan menghambat aktivitas tirosin kinase di sitoplasma. Hambatan pada sinyal kinase ini kemudian berdampak pada supresi proses biologis seperti angiogenesis dan adhesi sel, sekaligus meningkatkan respons imun tubuh terhadap sel kanker payudara tipe basal.



**Gambar 4.** Analisis pengayaan fungsional gen target potensial dari genus *Nigella* pada kanker payudara. (A) Pengayaan penyakit (DisGeNET) menunjukkan relevansi kuat dengan karsinoma payudara dan metastasis; (B) *Biological Process* (BP) menunjukkan peran sentral pada imunitas, angiogenesis, dan adhesi sel; (C) *Cellular Component* (CC) memberikan lokasi target dominan di membran dan sitoplasma; (D) *Molecular Function* (MF) mengonfirmasi fungsi target sebagai reseptor, kinase, dan tirosin kinase.

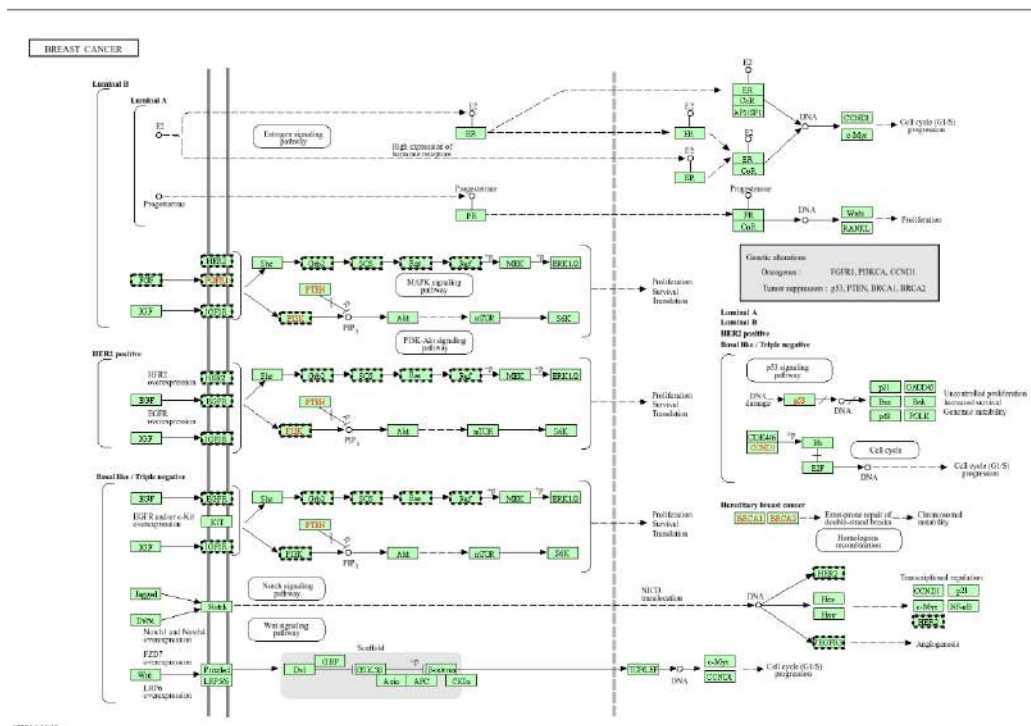
Analisis jalur KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) dilakukan untuk memverifikasi mekanisme molekuler di balik potensi antikanker genus *Nigella*. Pemetaan target pada jalur sinyal "Breast Cancer" (hsa05224) mengonfirmasi temuan topologi jaringan sebelumnya yang menempatkan EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) sebagai protein dengan konektivitas tertinggi. Sebagaimana divisualisasikan pada Gambar 5, peta jalur ini memvalidasi posisi strategis EGFR sebagai reseptor hulu (*upstream receptor*) yang krusial. Keberadaannya di permukaan sel menjadikannya "gerbang utama" yang menerima sinyal pertumbuhan ekstraseluler dan meneruskannya pada bagian internal sel kanker. Secara spesifik pada subtipe kanker payudara *Basal-like* atau *Triple-Negative*, overekspresi EGFR berfungsi sebagai inisiator bagi dua jalur sinyal onkogenik, meliputi jalur MAPK dan jalur PI3K-Akt. Aktivasi EGFR memicu rekrutmen kompleks protein adaptor Grb2/SOS yang

mengaktifkan sistem Ras-Raf-MEK-ERK (jalur MAPK), yang secara langsung memacu transkripsi gen untuk proliferasi sel tak terkendali. Secara bersamaan, EGFR juga mengaktifkan jalur PI3K-Akt-mTOR yang bertanggung jawab menjaga kelangsungan hidup sel (*cell survival*) dengan cara menghambat mekanisme kematian sel terprogram (apoptosis). Dengan demikian, EGFR memiliki peran ganda yang tidak hanya mengatur sel kanker untuk membelah, tetapi juga melindunginya dari kematian.

Lebih jauh lagi, merujuk pada Gambar 5 terkait peta KEGG, dapat diketahui peran EGFR melampaui batasan subtipe sel kanker spesifik. Meskipun studi ini difokuskan pada data transkriptomik tipe basal, mekanisme awal yang diregulasi oleh EGFR bersifat terhubung pada subtipe kanker payudara lainnya, yaitu *Luminal A/B* dan *HER2-positive*. Pada subtipe *HER2-positive*, EGFR kerap membentuk heterodimer dengan reseptor HER2 untuk memperkuat sinyal

mitogenik. Sementara pada subtipe *Luminal*, meskipun didominasi oleh reseptor hormon, aktivasi jalur MAPK yang juga dapat dipicu oleh aktivitas EGFR tetap berkontribusi signifikan pada progresi siklus sel melalui regulasi Cyclin D1 (*CCND1*). Hal ini mengindikasikan bahwa disregulasi pada level EGFR memiliki “efek domino” yang mempengaruhi berbagai varian molekuler kanker payudara. Oleh karena itu, temuan ini memberikan informasi bahwa intervensi terapeutik menggunakan senyawa bioaktif genus *Nigella* yang menargetkan EGFR

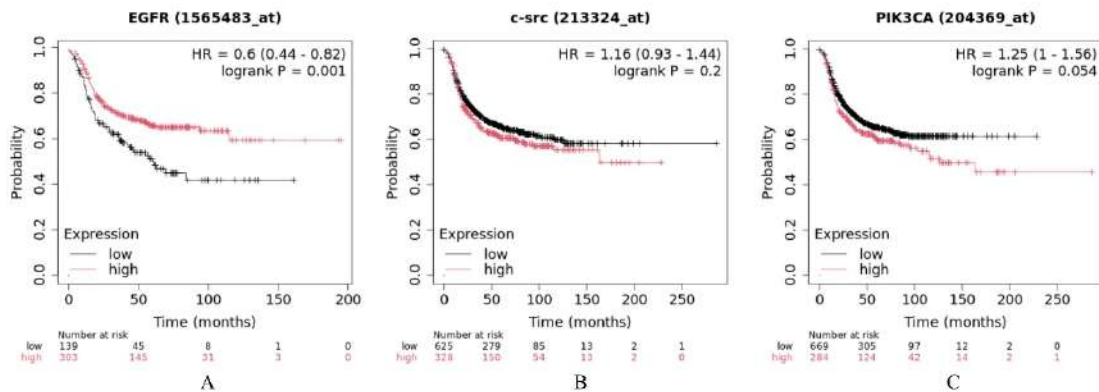
menjadi strategi pengobatan yang menjanjikan. Dengan memblokir EGFR di bagian awal, senyawa genus *Nigella* secara efektif memutus rantai sinyal ke jalur MAPK dan PI3K-Akt pada bagian akhir. Hambatan ini diprediksi memberikan dampak sistemik yang mampu mengganggu pertahanan sel kanker, menghentikan laju proliferasi, dan menginduksi apoptosis, menjadikan EGFR sebagai target molekuler paling prioritas dalam pengembangan obat berbasis bahan alam ini.



**Gambar 5.** Peta jalur sinyal Kanker Payudara (Breast Cancer Pathway - hsa05224) dari database KEGG. Kotak hijau menunjukkan protein target yang terlibat dalam jalur sinyal.

Analisis hubungan biologis dari konstruksi jaringan yang dibentuk divalidasi berdasarkan data klinis melalui analisis survival Kaplan-Meier terhadap gen dengan nilai *centrality* tertinggi dalam jaringan PPI, yaitu EGFR, SRC,

dan PIK3CA. Analisis ini bertujuan untuk mengevaluasi gen-gen utama yang teridentifikasi secara topologis juga memiliki keterkaitan dengan *outcome* klinis pasien kanker payudara tipe basal.



**Gambar 6.** Analisis survival Kaplan-Meier untuk gen dengan nilai *centrality* tertinggi dalam jaringan PPI, yaitu (A) EGFR, (B) SRC, dan (C) PIK3CA pada kanker payudara subtipe basal.

Merujuk pada Gambar 6, analisis *survival* yang melibatkan multi-dataset memberikan validasi klinis eksternal terhadap gen-gen utama yang teridentifikasi. Ekspresi EGFR menunjukkan hubungan yang signifikan secara statistik dengan *relapse-free survival* (RFS) pada pasien kanker payudara subtipe basal (HR = 0,60; IK 95% = 0,44–0,82; p = 0,001; FDR = 2%). Hal ini berkorelasi dengan dominasi ekspresi EGFR; dimana mayoritas pasien dalam kohort subtipe basal memiliki tingkat ekspresi EGFR yang tinggi (n=303) dibandingkan dengan kelompok ekspresi rendah (n=139) (Gambar 6). Secara biologis, tingginya ekspresi EGFR mengonfirmasi posisinya sebagai motor utama yang memfasilitasi sel kanker TNBC untuk dapat bertahan hidup (*survive*), berproliferasi, dan mempertahankan agresivitasnya. Menariknya, karena sel kanker TNBC sangat bergantung pada aktivitas EGFR untuk kelangsungan hidupnya, kanker payudara tipe basal menjadi jauh lebih sensitif dan rentan ketika pasien menerima intervensi terapeutik bertarget EGFR. Temuan ini secara tegas mengonfirmasi bahwa EGFR merupakan titik lemah biologis pada TNBC.

Sebaliknya, gen SRC tidak menunjukkan korelasi yang signifikan secara klinis dengan *survival* pasien (HR = 1,16; p = 0,1958; FDR = 100%), dan PIK3CA hanya menunjukkan kecenderungan yang belum memadai secara statistik (HR = 1,25; p = 0,0545; FDR = 100%). Hal ini didukung oleh profil dengan pola populasi yang terbalik dibandingkan EGFR; sebagian besar pasien subtipe basal pada awal pengamatan justru berada pada kelompok ekspresi rendah, baik untuk gen SRC (rendah: n=625; tinggi: n=328) maupun PIK3CA (rendah: n=669; tinggi: n=284). Fakta dari demografi kohort ini membuktikan bahwa meskipun SRC dan PIK3CA memiliki nilai *centrality* tinggi dalam jaringan molekuler, keduanya tidak mendominasi populasi dan tidak bertindak

sebagai penentu mutlak kelangsungan hidup sel kanker layaknya EGFR

Pendekatan transkriptomik yang mengombinasikan analisis jaringan dengan validasi multi-kohort ini secara efektif menutupi kelemahan generalisasi dari penggunaan dataset tunggal. Evaluasi dari populasi yang lebih luas membuktikan bahwa EGFR merupakan kandidat target yang ideal; tidak hanya karena posisi sentralnya dalam jaringan, tetapi juga karena tingginya tingkat ketergantungan sel tumor terhadap jalur ini. Oleh sebab itu, penghambatan pada reseptor EGFR dapat memutus sinyal proliferasi dan menginduksi apoptosis sel kanker payudara tipe basal dari senyawa bioaktif dari genus *Nigella*.

## PEMBAHASAN

Kanker payudara tipe basal (*Basal-like*) secara klinis sering dimanifestasikan sebagai *Triple-Negative Breast Cancer* (TNBC), merupakan salah satu jenis kanker dengan tantangan terbesar dalam bidang onkologi akibat agresivitasnya yang tinggi. Subtipe ini memiliki karakteristik oleh ketiadaan ekspresi reseptor Estrogen (ER), reseptor Progesteron (PR), dan HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), sehingga membuat terbatasnya opsi terapi konvensional seperti terapi hormonal (19). Gambaran klinis dari profil molekuler ini berpengaruh signifikan terhadap prognosis yang buruk, risiko metastasis yang tinggi, serta tingkat kekambuhan yang lebih cepat dibandingkan subtipe lainnya (20,21). Kondisi ini menempatkan TNBC sebagai penyumbang utama mortalitas akibat kanker payudara global (19,22).

Hingga saat ini, strategi pengobatan TNBC masih sangat bergantung pada penggunaan agen kemoterapi sitotoksik karena belum adanya target molekuler selektif. Namun, ketergantungan pada kemoterapi memberikan

tantangan klinis berupa toksisitas sistemik non-selektif dan tingginya insiden resistensi obat (19). Kompleksitas patofisiologi kanker, yang melibatkan berbagai jalur sinyal yang saling tumpang tindih, sering kali membuat pendekatan farmakologi konvensional yang berprinsip "satu obat, satu target" menjadi kurang efektif. Oleh karena itu, diperlukan langkah baru dalam menggeser paradigma menuju pendekatan yang lebih spesifik dalam penemuan terapeutik baru yang mampu memodulasi berbagai target sekaligus dengan efek samping minimal.

Dalam rangka menjawab kompleksitas tersebut, penelitian ini menerapkan strategi Farmakologi Jaringan (*Network Pharmacology/NP*) yang diintegrasikan dengan data transkriptomik dari *Gene Expression Omnibus* (GEO). NP merupakan metodologi revolusioner yang mentransformasi cara pandang penemuan obat dari reduksionis menjadi sistemik, yang selaras dengan prinsip obat herbal: "multi-komponen, multi-target" (23,24). Integrasi data GEO memberikan validasi klinis dengan menyoroti gen-gen yang mengalami disregulasi spesifik pada jaringan kanker, sehingga memperkuat relevansi prediksi komputasi. Keunggulan utama pendekatan ini adalah efisiensi waktu dan biaya yang signifikan karena mengurangi ketergantungan awal pada laboratorium basah (*wet-lab*), sekaligus memberikan jalur mekanisme molekuler yang presisi sebelum validasi eksperimental dilakukan (25,26).

Salah satu strategi dalam penelusuran kandidat obat adalah menggunakan tanaman berkhasiat obat. Tanaman Genus *Nigella* menunjukkan potensi kemopreventif dan terapeutik dalam bidang penemuan dan pengembangan obat kanker (27). Meskipun *Nigella sativa* merupakan spesies yang paling banyak diteliti, spesies lain seperti *Nigella damascena*, *Nigella arvensis*, dan *Nigella ciliaris* juga menunjukkan profil fitokimia dan hubungan etnofarmakologi yang menjanjikan. Beberapa senyawa bioaktif utama, dari *N. sativa* mencakup  $\alpha$ -Hederin, Thymol, Dithymoquinone (Nigellone) terutama thymoquinone (TQ), bersama dengan senyawa lain seperti seskuiterpen ( $\beta$ -elemene) dan saponin triterpen dari *N. damascena*, membentuk sistem yang bekerja secara sinergis sebagai agen anti kanker (28–30). Berbagai studi melaporkan bahwa TQ dan senyawa turunan *Nigella* memiliki aktivitas antikanker yang kuat, termasuk menghambat proliferasi, menginduksi apoptosis, serta memodulasi jalur sinyal esensial kanker (20,31). Keberagaman senyawa ini memungkinkan terjadinya efek polifarmakologi, sehingga

berbagai jalur karsinogenesis dapat dihambat secara simultan.

Pada model kanker payudara, khususnya TNBC, ekstrak *Nigella* dan TQ menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap berbagai tipe sel mencakup MCF-7, MDA-MB-231, dan BT-474. Efek paling menonjol diamati pada sel MDA-MB-231 dengan nilai  $IC_{50}$  rendah ( $\sim 11 \mu M$ ) serta inhibisi siklus sel pada fase G1 (32,33). Mekanisme aksi utamanya melibatkan aktivasi jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik, ditandai dengan peningkatan ekspresi p53, Bax, dan caspase-3/9, serta penurunan Bcl-2 (10,24). Selain induksi apoptosis, TQ dari *N. sativa* juga berperan dalam meningkatkan respon imun sitotoksik dengan menstimulasi sel *Natural Killer* (NK) untuk melepaskan granula sitolitik seperti perforin, granzyme B, dan interferon- $\alpha$  yang secara langsung menghancurkan sel tumor. Lebih lanjut, penggunaan *N. sativa* bersama doxorubicin pada pasien kanker payudara stadium III dan IV terbukti menurunkan kadar *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), sehingga efektif menekan inflamasi kronis yang sering memicu proliferasi, resistensi, dan metastasis sel kanker (34,35).

Potensi terapeutik genus *Nigella* tidak terbatas pada *N. sativa*. Kandungan senyawa  $\beta$ -elemene pada Ekstrak *Nigella damascena* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara tipe MCF-7 (36). Sementara itu, *Nigella arvensis* dan *Nigella ciliaris* secara empiris digunakan dalam berbagai penyakit termasuk obat kanker namun dengan mekanisme dan senyawa yang belum sepenuhnya tereksplorasi (37). Secara keseluruhan, metabolit sekunder dari berbagai spesies *Nigella* menunjukkan aktivitas sitotoksik dan sitostatik, termasuk terhadap sel kanker dengan mutasi p53 seperti pada TNBC (38).

Salah satu temuan dalam pemetaan mekanisme molekuler target pada studi ini adalah peran EGFR yang dominan dalam patofisiologi TNBC dalam jaringan interaksi protein-protein teridentifikasi sebagai kandidat target utama dari senyawa bioaktif genus *Nigella*. EGFR (atau HER1) diketahui diekspresikan secara berlebihan pada 45-70% kasus kanker payudara subtype *Basal-like*, sehingga umum dipakai sebagai marker molekuler TNBC (22,39). Overekspresi EGFR berkorelasi dengan prognosis buruk dan *disease-free survival* yang rendah, karena reseptor ini memicu kaskade sinyal Ras/MAPK yang mendorong proliferasi sel tak terkendali serta invasi tumor (31,32).

Namun demikian, ekspresi EGFR yang lebih tinggi berkorelasi dengan *relapse-free survival* (RFS) yang lebih baik berdasarkan analisis

survival. Temuan ini menunjukkan bahwa hubungan antara ekspresi EGFR dan outcome klinis tidak selalu mencerminkan peningkatan agresivitas tumor secara langsung. Oleh sebab itu, EGFR dapat dipandang sebagai marker biologis yang mencerminkan karakteristik molekuler tumor, termasuk kemungkinan sensitivitas terhadap terapi tertentu. Meskipun secara teori EGFR menjadi target TNBC yang sensitif, penggunaan inhibitor EGFR tunggal (seperti cetuximab) sering gagal dalam uji klinis TNBC akibat aktivasi jalur resistensi, seperti jalur reseptor MET (2,23). Hal ini kemudian mengonfirmasi kondisi ketergantungan onkogen, dimana sel tumor TNBC memiliki ketergantungan terhadap jalur EGFR untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Ketergantungan inilah yang justru menciptakan "titik lemah" biologis, menjadikan sel tumor sangat rentan dan sensitif terhadap intervensi terapeutik yang tepat (40,41).

Berdasarkan hasil transkriptomik, farmakologi jaringan dan analisis survival, senyawa bioaktif dari genus *Nigella*, diperkirakan mampu memberikan efek melalui mekanisme multi-target. Senyawa-senyawa ini tidak hanya berinteraksi dengan reseptor permukaan seperti EGFR, tetapi juga memodulasi jalur PI3K/Akt/mTOR dan NF- $\kappa$ B (32,42). Selain itu, TQ dan  $\beta$ -Elemene dilaporkan mampu menghambat EGFR, fosforilasi Akt dan meningkatkan ekspresi PTEN (28,30,43), yang berpotensi menekan sinyal proliferasi dan survival sel kanker secara lebih luas. Pendekatan multi-target pada penelitian ini memberikan keuntungan dibandingkan terapi target tunggal, khususnya dalam mengatasi mekanisme resistensi yang umum terjadi pada TNBC. Dengan demikian, kombinasi analisis bioinformatik dalam penelitian ini menunjukkan bahwa genus *Nigella* memiliki potensi sebagai kandidat terapi komplementer pada kanker payudara tipe basal. Temuan ini dapat menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan lebih lanjut, terutama dalam mengeksplorasi pemanfaatan senyawa alami sebagai agen ko-terapi yang berpotensi meningkatkan efektivitas pengobatan sekaligus mengurangi efek samping terapi konvensional dimasa mendatang.

Namun demikian, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, terutama karena pendekatan yang digunakan masih berbasis analisis *in silico* dan integrasi data sekunder, sehingga belum mencerminkan interaksi biologis secara langsung. Selain itu, penelitian ini masih terbatas pada tahap identifikasi target molekuler potensial dan belum mencakup analisis interaksi molekuler secara spesifik. Oleh karena itu,

diperlukan validasi lebih lanjut melalui studi eksperimental, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, serta pendekatan komputasional lanjutan dengan teknik *molecular docking* untuk mengonfirmasi mekanisme aksi, memprediksi dan mengidentifikasi kandidat senyawa bioaktif genus *Nigella* secara lebih komprehensif.

## KESIMPULAN

Kombinasi analisis transkriptomik dan farmakologi jaringan dalam penelitian ini mengidentifikasi sejumlah gen yang berpotensi terlibat dalam mekanisme kanker payudara tipe basal (TNBC). EGFR memiliki nilai *centrality* tertinggi dalam jaringan interaksi protein-protein dan menunjukkan hubungan signifikan dengan *relapse-free survival* (RFS). Temuan ini menunjukkan bahwa EGFR memiliki relevansi dalam jaringan molekuler TNBC dan berpotensi menjadi salah satu target yang perlu diteliti lebih lanjut.

## SARAN

Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan validasi eksperimental, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, guna mengonfirmasi mekanisme aksi senyawa bioaktif genus *Nigella*, khususnya terhadap target EGFR dan jalur sinyal terkait untuk meningkatkan efektivitas pengobatan dan mengurangi resistensi pada kanker payudara tipe basal.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Tadulako dan CV Tadulako Pharmameds atas dukungan fasilitas dan akses komputasi yang telah diberikan untuk memfasilitasi penyelesaian analisis data dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Abu-Darwish MS, Efferth T. *Medicinal Plants from Near East for Cancer Therapy*. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 31;9:56. doi:10.3389/fphar.2018.00056
2. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2750–67. doi:10.1172/JCI45014
3. Pradeep PP, Mohanty B, Lobo CL, Balusamy SR, Shetty A, Perumalsamy H, et al. *Harnessing the nutraceuticals in early-stage*

- breast cancer: mechanisms, combinational therapy, and drug delivery. *J Nanobiotechnology*. 2024 Sep 18;22(1):574. doi:10.1186/s12951-024-02815-8
4. Xu D, Ma Y, Zhao B, Li S, Zhang YU, Pan S, et al. Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor- $\kappa$ B pathways in human cholangiocarcinomas both in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2014 May;31(5):2063–70. doi:10.3892/or.2014.3059
  5. Wang W, Zhai GQ, Xin M, Li J, Liao JJ, Liang J, et al. Integrated network pharmacology and transcriptomics to reveal the mechanism of *Passiflora* against depressive disorder: An observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2024 Oct 11;103(41):e39309. doi:10.1097/MD.00000000000039309 PubMed PMID: 39465851; PubMed Central PMCID: PMC11479432.
  6. Dadandi MY, Kökdil G, İlçim A, Özbilgin B. Seed macro and micro morphology of the selected *Nigella* (Ranunculaceae) taxa from Turkey and their systematic significance. *Biologia*. 2009 Apr;64(2):261–70. doi:10.2478/s11756-009-0030-x
  7. Abdel-Hamid NM, Abdel-Ghany MI, Nazmy MH, Amgad SW. Can methanolic extract of *Nigella sativa* seed affect glyco-regulatory enzymes in experimental hepatocellular carcinoma? *Environ Health Prev Med*. 2013 Jan;18(1):49–56. doi:10.1007/s12199-012-0292-8
  8. Lang M, Borgmann M, Oberhuber G, Evstatiev R, Jimenez K, Dammann KW, et al. *Thymoquinone attenuates tumor growth in ApcMin mice by interference with Wnt-signaling*. *Mol Cancer*. 2013 Dec;12(1):41. doi:10.1186/1476-4598-12-41
  9. Almatroodi SA, Almatroudi A, Alsahli MA, Khan AA, Rahmani AH. *Thymoquinone, an Active Compound of Nigella sativa: Role in Prevention and Treatment of Cancer*. *CPB*. 2020 Sep 21;21(11):1028–41. doi:10.2174/1389201021666200416092743
  10. Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. *Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species*. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Jun;235(6):751–60. doi:10.1258/ebm.2010.009369
  11. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, et al. Androgen receptor- and E2F-1-targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7782–8. doi:10.1158/0008-5472.can-07-1483
  12. Kundu J, Choi BUY, Jeong CH, Kundu JK, Chun KS. Thymoquinone induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through inactivation of STAT3 by blocking JAK2- and Src-mediated phosphorylation of EGF receptor tyrosine kinase. *Oncol Rep*. 2014 Aug;32(2):821–8. doi:10.3892/or.2014.3223
  13. Fathy M, Nikaido T. In vivo attenuation of angiogenesis in hepatocellular carcinoma by *Nigella sativa*. *Turk J Med Sci*. 2018 Feb 23;48(1):178–86. doi:10.3906/sag-1701-86
  14. Imani S, Wei C, Cheng J, Asaduzzaman Khan M, Fu S, Yang L, et al. MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):21362–79. doi:10.18632/oncotarget.15214
  15. Li ZY, Zhang Z, Cao XZ, Feng Y, Ren SS. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res*. 2020 Oct;48(10):300060520964340. doi:10.1177/0300060520964340
  16. Gomathinayagam R, Ha JH, Jayaraman M, Song YS, Isidoro C, Dhanasekaran DN. *Chemopreventive and Anticancer Effects of Thymoquinone: Cellular and Molecular Targets*. *J Cancer Prev*. 2020 Sep 30;25(3):136–51. doi:10.15430/JCP.2020.25.3.136
  17. Aslam A, Minshawi F, Almasmoum H, Almaini R, Alsaegh A, Mahbub AA, et al. *Exploring potential additive effects of 5-fluorouracil, thymoquinone, and coenzyme Q10 triple therapy on colon cancer cells in relation to glycolysis and redox status modulation*. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2025 Mar 10;37(1):7. doi:10.1186/s43046-025-00261-7
  18. Alamri AM, Assiri AA, Yousuf A, Khan NU. *Exploring Nigella Sativa's medicinal capacity against skin cancer pathways using network pharmacology and molecular docking*. *Sci Rep*. 2025 Oct 3;15(1):34609. doi:10.1038/s41598-025-18200-w
  19. Dogra A, Mehta A, Doval DC. *Are basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancers really different?* *J Oncol*. 2020 Mar 16;2020:4061063. doi:10.1155/2020/4061063
  20. Barkat MA, Harshita, Ahmad J, Khan MA,

- Beg S, Ahmad FJ. *Insights into the targeting potential of thymoquinone for therapeutic intervention against triple-negative breast cancer*. *Curr Drug Targets*. 2018 Jan 5;19(1). doi:10.2174/1389450118666170612095959
21. Ünal TD, Hamurcu Z, Delibaşı N, Çınar V, Güler A, Gökçe S, et al. *Thymoquinone inhibits proliferation and migration of MDA-MB-231 triple Negative Breast Cancer cells by suppressing autophagy, Beclin-1 and LC3*. *Anticancer Agents Med Chem*. 2021;21(3):355–64. doi:10.2174/1871520620666200807221047
  22. Leidy J, Khan A, Kandil D. *Basal-Like Breast Cancer: Update on Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2014 Jan 1;138(1):37–43. doi:10.5858/arpa.2012-0439-RA
  23. Lehmann BD, Pietsenpol JA. *Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer*. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S36-40. doi:10.1016/j.breast.2015.07.009
  24. Woo CC, Hsu A, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB. *Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: The role of p38 MAPK and ROS*. *PLoS One*. 2013 Oct 2;8(10):e75356. doi:10.1371/journal.pone.0075356
  25. Li H, Li T, Quang D, Guan Y. *Network propagation predicts drug synergy in cancers*. *Cancer Res*. 2018 Sep 15;78(18):5446–57. doi:10.1158/0008-5472.can-18-0740
  26. Li S, Zhang B, Zhang N. *Network target for screening synergistic drug combinations with application to traditional Chinese medicine*. *BMC Syst Biol*. 2011 Jun 20;5 Suppl 1(Suppl 1):S10. doi:10.1186/1752-0509-5-S1-S10
  27. Dilshad A, Abulkhair O, Nemenqani D, Tamimi W. *Antiproliferative properties of methanolic extract of Nigella sativa against the MDA-MB-231 cancer cell line*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(11):5839–42. doi:10.7314/apjcp.2012.13.11.5839
  28. Ahmed MM. *Dual Targeting of EGFR and Estrogen Receptor  $\alpha$  by Plant-Derived Thymoquinone: An in Silico Docking, ADMET, and Molecular Dynamics Study or Breast Cancer Therapy*. *ejeba*. 2026 Mar 1;3(2):188–202. doi:10.59324/ejeba.2026.3(2).15
  29. Xu C, Jiang ZB, Shao L, Zhao ZM, Fan XX, Sui X, et al.  *$\beta$ -Elemene enhances erlotinib sensitivity through induction of ferroptosis by upregulating lncRNA H19 in EGFR-mutant non-small cell lung cancer*. *Pharmacological Research*. 2023 May;191:106739. doi:10.1016/j.phrs.2023.106739
  30. Xie Q, Li F, Fang L, Liu W, Gu C. *The Antitumor Efficacy of  $\beta$ -Elemene by Changing Tumor Inflammatory Environment and Tumor Microenvironment*. Ni H, editor. *BioMed Research International*. 2020 Jan;2020(1):6892961. doi:10.1155/2020/6892961
  31. Faysal M, Zehravi M, Al Amin M, Sweilam SH, Panigrahy UP, Khan AS, et al. *Targeting key molecular mechanisms in triple-negative breast cancer therapies with natural compounds*. *Curr Pharm Des*. 2025 Oct 14;32. doi:10.2174/0113816128411154250918060514
  32. Khan A, Aldebasi YH, Alsuhaibani SA, Khan MA. *Thymoquinone augments cyclophosphamide-mediated inhibition of cell proliferation in breast cancer cells*. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Apr 29;20(4):1153–60. doi:10.31557/APJCP.2019.20.4.1153
  33. Sutton KM, Greenshields AL, Hoskin DW. *Thymoquinone, A bioactive component of black caraway seeds, causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells with mutant p53*. *Nutr Cancer*. 2014 Apr 3;66(3):408–18. doi:10.1080/01635581.2013.878739
  34. Dastjerdi M, Mehdiabady E, Iranpour F, Bahramian H. *Effect of thymoquinone on P53 gene expression and consequence apoptosis in breast cancer cell line*. *Int J Prev Med*. 2016;7(1):66. doi:10.4103/2008-7802.180412
  35. Syahril F, Wirdah A, Nur Qodir, Irfanuddin, Irsan Saleh, Yenny Dian Andayani, et al. *Effectiveness of Nigella sativa Addition against TNF-Alpha in Stage III and IV Breast Cancer Undergoing Doxorubicin and Cyclophosphamide Chemotherapy at Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia*. *Bioscmed*. 2023 Dec 12;8(2):4009–14. doi:10.37275/bsm.v8i2.924
  36. Scognamiglio M, Maresca V, Basile A, Pacifico S, Fiorentino A, Bruno M, et al. *Phytochemical Characterization, Antioxidant, and Anti-Proliferative Activities of Wild and Cultivated Nigella damascena Species Collected in Sicily*

- (Italy). *Antioxidants*. 2024 Mar 27;13(4):402. doi:10.3390/antiox13040402
37. Salehi B, Quispe C, Imran M, Ul-Haq I, Živković J, Abu-Reidah IM, et al. *Nigella Plants – Traditional Uses, Bioactive Phytoconstituents, Preclinical and Clinical Studies*. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 26;12:625386. doi:10.3389/fphar.2021.625386
  38. Shabani H, Karami MH, Kolour J, Sayyahi Z, Parvin MA, Soghala S, et al. *Anticancer activity of thymoquinone against breast cancer cells: Mechanisms of action and delivery approaches*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Sep;165:114972. doi:10.1016/j.biopha.2023.114972
  39. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. *Subtypes of Breast Cancer*. In: *Breast Cancer* [Internet]. Exon Publications; 2022. p. 31–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes> doi:10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes
  40. Cruz-Gordillo P, Honeywell ME, Harper NW, Leete T, Lee MJ. *ELP-dependent expression of MCL1 promotes resistance to EGFR inhibition in triple-negative breast cancer cells*. *Sci Signal*. 2020 Nov 17;13(658):eabb9820. doi:10.1126/scisignal.abb9820
  41. Heideman MR, Hynes NE. *AXL/epidermal growth factor receptor (EGFR) complexes in breast cancer - culprits for resistance to EGFR inhibitors?* *Breast Cancer Res*. 2013 Oct;15(5):315. doi:10.1186/bcr3564
  42. Rajput S, Kumar BNP, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M. *Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells*. *Life Sci*. 2013 Nov;93(21):783–90. doi:10.1016/j.lfs.2013.09.009
  43. Arafa ESA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, et al. *Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells*. *Mutat Res*. 2011 Jan 10;706(1–2):28–35. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.10.007



*Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons license unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.*