

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker kolorektal adalah suatu keganasan polip adenomatosis yang sering menyerang kolon dan *rectum*. Kanker kolorektal merupakan penyebab kematian kedua setelah kanker paru yang sebagian besar terjadi pada usia lebih dari 50 tahun. Prognosis penyakit ini bergantung pada tingkat invasi dan metastasis tumor (Gommeaux *et al.*, 2007). Lokasi kanker kolorektal mempengaruhi manifestasi klinis yang ditimbulkannya. Predileksi tersering adalah kolon sigmoid, yang menimbulkan manifestasi klinik seperti *hematochezia*, tenesmus, diameter faeces yang mengecil, haemorrhoid, dan perdarahan *rectum* (Mayer, 2008).

*Inflammatory bowel disease* (IBD) merupakan suatu kondisi inflamasi kronis yang disebabkan oleh kegagalan regulasi sistem imun, kerentanan genetik, dan rangsangan flora normal di saluran cerna (Liu and Crawford., 2005). IBD terjadi pada 1,4 juta orang di Amerika Serikat dan telah menghabiskan biaya pengobatan sekurang-kurangnya dua miliar dolar. IBD meliputi dua kelainan, yaitu *Crohn's disease* (CD) dan *ulcerative colitis* (UC) (Popivanova *et al.*, 2008). Di Indonesia dari berbagai laporan terdapat kenaikan jumlah kasus tetapi belum ada laporan mengenai angka pasti insidensi karsinoma kolorektal. Sedangkan dari evaluasi data-data di Departemen Kesehatan mendapatkan angka 1,8 per 100.000 penduduk (Kelompok Kerja Adenokarsinoma Kolorektal Indonesia, 2004).

IBD kronis, baik UC maupun CD dapat meningkatkan risiko timbulnya kanker kolorektal, karena inflamasi intestinal kronis merupakan faktor risiko utama. Risiko kanker kolorektal berkorelasi dengan luas dan durasi penyakit ini (Gommeaux *et al.*, 2007). Saat terjadi inflamasi, makrofag akan melepaskan *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Gommeaux *et al.*, 2007; Burstein and Fearon, 2008) dan bila berlangsung kronis memproduksi kompleks *milieu* faktor

pertumbuhan dan sitokin–sitokin yang menyebabkan hiperplasia yang meluas. Hal ini menyebabkan proliferasi dan signal antiapoptosis yang dihasilkan selama terjadinya proses inflamasi kronis akan sinergis dengan kerusakan DNA, sehingga meningkatkan insidensi terjadinya kanker (Meira *et al.*, 2008).

Injeksi *azoxy-methane* (AOM) 12 mg/kgBB pada mencit selama 5 hari yang dikombinasikan dengan 3 kali siklus pemberian *dextran sulfate sodium* (DSS) 2,5 % selama 5 hari diikuti dengan pemberian aquadest selama 16 hari dapat meningkatkan insidensi kolitis yang mengarah menuju keganasan (Okayasu *et al.*, 1996; Stevceva *et al.*, 1999; Hamamoto *et al.*, 1999; Sigmund *et al.*, 2001; Popivanova *et al.*, 2008).

Siklooksigenase (COX) merupakan enzim kunci yang berperan dalam produksi prostaglandin (PG) dan eicosanoid lain yang berperan dalam modulasi pertumbuhan sel dan immunosurveillance sel-sel kanker (Loukanov *et al.*, 2009). Studi epidemiologi menunjukkan bahwa obat-obat antiinflamasi non-steroid (OAINS) seperti aspirin terbukti efektif dalam mengurangi insidensi kanker kolorektal. Pada kanker kolorektal ternyata ekspresi COX-2 meningkat dan OAINS terbukti dapat menghambat aktivitas siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2) (Kune *et al.*, 1988; Thun *et al.*, 1991; Sano *et al.*, 1995; Greenhough *et al.*, 2009).

Radikal bebas yang diproduksi dalam proses inflamasi merupakan senyawa yang dapat menimbulkan stres oksidatif yang pada akhirnya dapat memperparah reaksi inflamasi itu sendiri, sehingga menyebabkan penyakit berkembang menuju ke arah keganasan. Senyawa antioksidan merupakan penangkal radikal bebas yang ada dalam tubuh. Sebenarnya tubuh dapat menghasilkan antioksidan endogen secara alamiah dalam upaya menghadapi senyawa radikal bebas, akan tetapi jumlahnya terbatas. Bila radikal bebas dalam tubuh berlebihan maka dibutuhkan senyawa antioksidan eksogen (Khie Khiong dkk., 2008; Khie Khiong dkk., 2009a).

Salah satu sumber senyawa antioksidan eksogen adalah buah merah yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Papua dalam kehidupan sehari-hari. Masyarakat Papua memanfaatkan buah merah sebagai sumber pangan sehari-hari dan memiliki kondisi kesehatan yang lebih baik dibandingkan wilayah lainnya (I Made Budi, 2005). Buah

merah mengandung banyak zat berkhasiat alami antara lain adalah karotenoid, beta-karoten, alfa-tokoferol, asam oleat, asam linoleat, asam linolenat dan dekanolat, omega-3 dan omega-9 yang dapat berperan sebagai senyawa antioksidan (I Made Budi, 2005; Machmud Yahya dan Bernard Wahyu Wiryanta, 2005). Testimoni mengenai khasiat buah merah secara empiris sebagai pengendali beragam penyakit seperti kanker, hipertensi, dan infeksi telah banyak dilaporkan, namun penelitian baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo* belum banyak dilakukan (I Made Budi, 2005; Surono *et al.*, 2008).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian sari buah merah sebanyak 0,1 mL/hari selama 15 hari menyebabkan peningkatan proliferasi limfosit dan terjadi penurunan kadar IFN- $\gamma$  pada mencit yang diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* (Hana Ratnawati dkk., 2008; Khie Khiong dkk., 2009b). Selain itu, pemberian 0,1 mL sari buah merah setiap hari selama 3 minggu ternyata selain dapat menurunkan derajat keparahan penyakit kolitis yang ditandai dengan menurunnya nilai *clinical score colitis* juga dapat meningkatkan proliferasi limfosit pada mencit yang diinduksi kolitis dengan DSS (Khie Khiong dkk., 2008). Sari buah merah 0,1 mL setara dengan 30 mL atau 2 sendok makan pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg.

Berdasarkan hal-hal di atas perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui peranan buah merah terhadap ekspresi COX-2 dan insidensi tumor dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit yang diinduksi kanker kolorektal dengan AOM dan DSS.

## 1.2 Identifikasi Masalah

- Apakah sari buah merah dapat menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model kanker kolorektal.

### **1.3. Maksud dan Tujuan**

Maksud penelitian adalah untuk mengetahui efek buah merah sebagai tanaman obat yang dapat menghambat kanker kolorektal.

Tujuan penelitian adalah untuk mengukur/menilai peranan buah merah dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit yang diinduksi kanker kolorektal dengan AOM dan DSS.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat akademis adalah memperluas wawasan pembaca mengenai tanaman obat asli Indonesia, khususnya buah merah dalam menghambat kanker kolorektal pada mencit model kanker kolorektal.

Manfaat praktis adalah mengeksplorasi potensi buah merah dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model kanker kolorektal.

### **1.5 Kerangka Pemikiran dan Hipotesis**

#### **1.5.1 Kerangka Pemikiran**

Kanker kolorektal adalah suatu keganasan polip adenomatosa yang sering menyerang kolon dan rektum. Keganasan ini disebabkan oleh mutasi protoonkogen *K-RAS*, hipometilasi DNA, kehilangan DNA pada gen suppressor tumor *adenomatous polyposis coli* (APC) pada kromosom 5 (5q21), atau kehilangan alel kromosom 18q dan 17p. Kanker kolorektal adalah kanker tersering kedua di Amerika Serikat dengan persentase kematian 10% (Gommeaux *et al.*, 2007; Mayer., 2008).

*Inflammatory bowel disease* (IBD) kronis, baik UC maupun CD dapat meningkatkan risiko timbulnya kanker kolorektal, karena inflamasi intestinal kronik

merupakan faktor risiko utama. Risiko kanker kolorektal berkorelasi dengan luas dan durasi penyakit ini (Liu and Crawford., 2005; Gommeaux *et al.*, 2007).

Inflamasi kronis mempunyai karakteristik adanya periode inflamasi aktif yang terpisah dengan periode inaktivasi. Inflamasi aktif meningkatkan aktivasi dan rekrutmen leukosit (neutrofil, eosinofil dan monosit yang akan berdiferensiasi menjadi makrofag). Leukosit dan sel fagositik mengeluarkan sitokin proinflamasi, kemokin, faktor pertumbuhan (*growth factor*) dan *matrix degrading enzyme*, yang memiliki pengaruh yang kuat terhadap sel pada lingkungan mikro yang lokal. Saat terjadi inflamasi, secara normal makrofag akan melepaskan *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Gommeaux *et al.*, 2007; Meira *et al.*, 2008).

Inflamasi kronik memproduksi kompleks *milieu* faktor pertumbuhan dan sitokin–sitokin yang menyebabkan hiperplasia yang meluas. Hal ini menyebabkan proliferasi dan signal antiapoptosis yang dihasilkan selama terjadinya proses inflamasi kronis akan sinergis dengan kerusakan DNA, sehingga meningkatkan insidensi terjadinya kanker. Efek lain yang hampir sama adalah kegagalan dalam signal proliferasi dan antiapoptosis yang meningkatkan dan memperberat kanker yang disebabkan oleh mutasi (Meira *et al.*, 2008).

Inflamasi yang tidak terkontrol berhubungan dengan stres oksidatif dan kerusakan selular oksidatif. Lesi DNA dapat terjadi secara langsung ketika terjadi modifikasi basa ROS atau secara tidak langsung yang merupakan hasil peroksidasi lipid yang bereaksi dengan DNA. Pada proliferasi sel, lesi DNA oksidatif menginduksi terjadinya mutasi gen supresor tumor dan onkogen, seperti mutasi pada gen p53 (*encoding tumor suppressor*). ROS dan RNS memicu terjadinya onkogenesis dengan mengubah proliferasi sel dan kematian sel. Stres oksidatif dan kerusakan selular oksidatif yang merupakan *hallmark* IBD memegang peranan penting pada IBD dan *IBD-carcinogenesis* (Gommeaux *et al.*, 2007).

Injeksi *azoxy-methane* (AOM) 12 mg/kg berat badan per mencit selama 5 hari yang dikombinasikan dengan 3 kali siklus pemberian *dextran sulfate sodium* (DSS)

2,5 % (w/v) selama 5 hari diikuti dengan pemberian aquadest selama 16 hari dapat meningkatkan insidensi kolitis yang mengarah menuju keganasan (Okayasu *et al.*, 1996; Stevceva *et al.*, 1999; Hamamoto *et al.*, 1999; Sigmund *et al.*, 2001; Popivanova *et al.*, 2008).

Mekanisme terjadinya kolitis dan kanker kolorektal pada model mencit yang diberi AOM dan DSS belum sepenuhnya terungkap, namun toksisitas langsung terhadap sel epitel kolon, peningkatan permeabilitas sel epitel, dan aktivasi makrofag dipercaya berperan penting dalam proses ini. Sifat toksik DSS terhadap sel epitel kolon menyebabkan kerusakan barrier sel epitel kolon yang akan mempermudah monosit-makrofag pada lamina propria masuk ke dalam fase aktivasi. Makrofag akan mempresentasikan antigen ke sel T dan mensekresikan sitokin proinflamasi. Sel T yang teraktivasi berperan sebagai faktor yang memperberat patologi kolitis yang diinduksi DSS (Kim *et al.*, 2006). Dieleman dkk, melaporkan bahwa limfosit memegang peranan dalam perkembangan kolitis yang diinduksi dengan DSS (Dieleman *et al.*, 1998).

Siklooksigenase (COX) merupakan enzim kunci yang berperan dalam produksi prostaglandin (PG) dan eicosanoid lain yang berperan dalam modulasi pertumbuhan sel dan immunosurveillance sel-sel kanker (Loukanov *et al.*, 2009). Studi epidemiologi menunjukkan bahwa obat-obat antiinflamasi non-steroid (OAINS) seperti aspirin terbukti efektif dalam mengurangi insidensi kanker kolorektal. Pada kanker kolorektal ternyata ekspresi COX-2 yang meningkat dan OAINS terbukti dapat menghambat aktivitas COX-1 dan COX-2 (Kune *et al.*, 1988; Thun *et al.*, 1991; Sano *et al.*, 1995). COX-2 mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) yang penting sebagai mediator angiogenesis dalam perkembangan tumor (Sonoshita *et al.*, 2001; Mutoh *et al.*, 2002; Seno, 2002; Iniquez *et al.*, 2003). Pada penelitian terhadap mencit yang diinduksi kolitis dengan AOM dan DSS, didapatkan bahwa ekspresi COX-2 meningkat dan pemberian antagonis TNF- $\alpha$  akan

menyebabkan penurunan ekspresi COX-2 dan angiogenesis tumor (Popivanova *et al.*, 2008).

Kolitis yang mengarah ke kanker kolorektal merupakan penyakit yang ditandai dengan reaksi inflamasi yang berlangsung terus-menerus yang bila tidak diobati dapat mengakibatkan keganasan. Radikal bebas yang dihasilkan dalam proses inflamasi merupakan senyawa yang dapat menimbulkan stres oksidatif yang pada akhirnya dapat memperparah reaksi inflamasi itu sendiri, sehingga menyebabkan penyakit berkembang menuju ke arah keganasan. Senyawa antioksidan merupakan penangkal radikal bebas yang ada dalam tubuh. Sebenarnya tubuh dapat menghasilkan antioksidan endogen secara alamiah dalam upaya menghadapi senyawa radikal bebas, akan tetapi jumlahnya terbatas. Bila radikal bebas dalam tubuh berlebihan maka dibutuhkan senyawa antioksidan eksogen (Khie Khiong dkk., 2008).

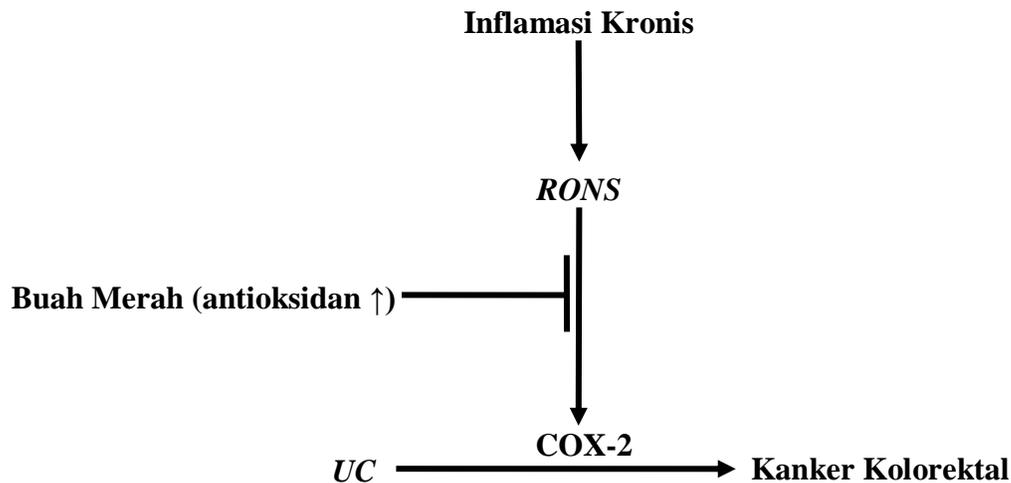
Salah satu sumber senyawa antioksidan eksogen adalah buah merah yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Papua dalam kehidupan sehari-hari. Khasiat buah merah adalah pengendali beragam penyakit seperti kanker, hipertensi, dan infeksi. Buah merah mengandung banyak zat berkhasiat alami antara lain adalah karotenoid, beta-karoten, alfa-tokoferol, asam oleat, asam linoleat, asam linolenat dan dekanolat, omega-3 dan omega-9 yang dapat berperan sebagai senyawa antioksidan (I Made Budi, 2005; Machmud Yahya dan Bernard Wahyu Wiryanta, 2005). Kandungan rata-rata zat-zat antioksidan di dalam buah merah termasuk tinggi, yaitu karoten 12.000 ppm, beta-karoten 7.000 ppm, dan tokoferol 11.000 ppm (I Made Budi, 2005). Selain itu ternyata buah merah juga mengandung *β-cryptoxantin* sebanyak 1,460 µg per 100 g. *β-cryptoxantin* banyak ditemukan pada sayuran yang berwarna hijau-kekuningan dan banyak digunakan sebagai agen terapi untuk kanker paru-paru. Kandungan *β-cryptoxantin* buah merah sebanyak 0,015 µg/mL dapat menghambat pertumbuhan sel kanker paru-paru A549 secara *in vitro* (Suroño *et al.*, 2008).

Konsumsi beta-karoten 30 mg/hari selama 2-3 bulan dapat memperbanyak sel imun, seperti limfosit T dan sel *natural killer* (NK) (Watson *et al.*, 1991; Kazi *et al.*,

1997). Senyawa antioksidan diketahui dapat meningkatkan proliferasi splenosit, kadar antibodi, dan massa limpa serta timus (Yan *et al.*, 2007). Beberapa penelitian membuktikan bahwa kegagalan respon imun bawaan berperan dalam patogenesis terjadinya IBD dan limfosit juga terlibat dalam perkembangan kolitis yang diinduksi DSS (Ohkawara *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian sari buah merah sebanyak 0,1 mL/hari selama 15 hari menyebabkan peningkatan proliferasi limfosit dan menyebabkan terjadinya penurunan kadar IFN- $\gamma$  pada mencit yang diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* (Hana Ratnawati dkk., 2008; Khie Khiong dkk., 2009b). Pemberian 0,1 mL sari buah merah setiap hari selama 3 minggu ternyata selain dapat menurunkan derajat keparahan penyakit yang ditandai dengan menurunnya nilai *clinical score colitis* juga dapat meningkatkan proliferasi limfosit pada mencit yang diinduksi kolitis dengan DSS (Khie Khiong *et al.*, 2008). Peningkatan proliferasi limfosit ini diduga akan menghambat produksi COX-2 dengan demikian reaksi inflamasi dapat dikurangi. Sari buah merah 0,1 mL setara dengan 30 mL atau 2 sendok makan pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg.

Berdasarkan hal-hal di atas maka penelitian ini dilakukan untuk memberikan gambaran mengenai pengaruh buah merah dalam menghambat produksi COX-2 pada mencit yang diinduksi kanker kolorektal dengan AOM dan DSS sehingga reaksi inflamasi dapat dikurangi. Skema kerangka pemikiran dapat dilihat pada gambar 1.1.



Gambar 1.1 Skema Kerangka Pemikiran Penelitian

### 1.5.2 Hipotesis Penelitian

- Sari buah merah menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model kanker kolorektal.

### 1.6 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah prospektif eksperimental laboratorium sungguhan bersifat komparatif dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ekspresi COX-2 dinilai menggunakan metode RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*). Analisis statistik menggunakan uji ANAVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji beda rata-rata *Tukey HSD*, dengan tingkat kepercayaan 95% yaitu suatu perbedaan dikatakan bermakna bila nilai  $p \leq 0,05$ .