

# PEMBERIAN TEPUNG GANYONG (*Canna edulis* Kerr.) MENURUNKAN EKSPRESI Ki67 PADA JARINGAN USUS BESAR TIKUS YANG DIINDUKSI AOM/DSS

## CANNA ADMINISTRATION REDUCED Ki67 EXPRESSION OF RAT COLON TISSUE THAT INDUCED BY AOM/DSS

Nur Mahmudah<sup>1</sup>, Dewajani Purnomosari<sup>2</sup>, Yustina Andwi Ari Sumiwi<sup>2</sup>

1 Bagian Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UMS

2 Bagian Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UGM

Korespondensi: dr. Nur Mahmudah, M. Sc. Email: nm189@ums.ac.id

### ABSTRAK

Kanker usus besar merupakan kanker yang memiliki insiden dan mortalitas tinggi. Karsinogenesis ditandai oleh proliferasi sel yang tidak terkontrol, yang dapat dilihat dengan adanya peningkatan ekspresi Ki67. Kejadian kanker usus besar meningkat akhir-akhir ini yang dimungkinkan terjadi akibat pola makan masyarakat modern yang buruk. Masyarakat modern lebih menyukai makanan cepat saji, yang rendah serat dibandingkan makanan sehat yang kaya serat, seperti ganyong. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek pemberian ganyong terhadap ekspresi Ki67 pada jaringan usus besar tikus yang diinduksi AOM/DSS. Jenis penelitian ini merupakan eksperimental dengan post test only group design. Penelitian ini menggunakan tikus model kanker usus besar yang dibuat dengan induksi AOM/DSS. Perlakuan ganyong diberikan selama 16 minggu, diberikan mulai 2 minggu sebelum induksi AOM hingga sebelum terminasi. Ekspresi Ki67 dilihat dengan metode imunohistokimia, kemudian dihitung menggunakan software Image J. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ganyong tidak menurunkan ekspresi Ki67 pada tikus yang diinduksi AOM/DSS ( $p = 0,101$ ). Kesimpulannya bahwa pemberian ganyong pada tikus yang diinduksi AOM/DSS tidak menghambat proliferasi sel.

**Kata Kunci:** Ganyong, Ki67, Induksi Aom/Dss.

### ABSTRACT

Colon cancer is a cancer that has a high incidence and mortality. Carcinogenesis is characterized by uncontrolled cell proliferation, which can be seen in the presence of increased Ki67 expression. The incidence of colon cancer has increased in recent years, which may have been due to the poor diet of modern society. Modern society prefers fast food, which is low in fiber compared to healthy foods rich in fiber, such as ganyong. This study aims to examine the effect of canna administration on Ki67 expression in AOM / DSS-induced rectum colon tissue. This research type is experimental with post test only group design. This study used a mouse model of colon cancer made with AOM / DSS induction. Canna administration was given for 16 weeks, given 2 weeks before AOM induction until termination. Ki67 expression seen with immunohistokimia method, then calculated using Image J software. The results showed that canna administration did not decrease of Ki67 expression in rats induced AOM / DSS ( $p = 0,101$ ). In conclusion that canna administration to rats induced by AOM / DSS did not inhibit cell proliferation.

**Keywords:** Canna, Ki67, AOM / DSS Induction.

### PENDAHULUAN

Kanker usus besar merupakan kanker dengan insiden dan mortalitas yang tinggi di seluruh negara, termasuk Indonesia. Kejadian kanker usus besar sangat tinggi di negara maju (55%), namun mortalitas lebih tinggi di negara berkembang (52%), termasuk Indonesia, dibandingkan negara maju (Globocan, 2012). Hal ini dimungkinkan, pemeriksaan skrining dan

penunjang serta tatalaksana kanker usus besar di negara berkembang belum sebaik di negara maju.

Kanker ditandai oleh adanya proliferasi sel yang tidak terkontrol. Proliferasi sel yang tidak terkontrol ini dapat diketahui dengan meningkatnya ekspresi marker proliferasi sel, seperti: Ki67 dan PCNA. Ki67 merupakan protein nuklear, yang berhubungan kuat dengan proliferasi sel somatik (Urruticoechea *et al.*, 2005; Uzma *et*

al., 2008). Ekspresi Ki67 tinggi pada hewan model kanker usus besar yang diinduksi *azoxymethane* dan *dextran sodium sulphate* (AOM/DSS), menggunakan metode imunofluoresensi (Shukla et al., 2016).

Karsinogenesis usus besar pada tikus yang diinduksi AOM/DSS membutuhkan waktu sekitar 8 minggu untuk mencapai tahap karsinoma (Tanaka et al., 2003; Tanaka et al., 2009; Tanaka et al., 2012; Robertis et al., 2011). Waktu yang lama ini dapat dimanfaatkan untuk memberikan suatu pencegahan menuju arah perburukan (karsinoma). Salah satu pencegahan yang terbukti menurunkan

risiko kanker usus besar adalah dengan makan makanan tinggi serat (World Cancer Research Fund (WCRF), 2011). Peneliti tertarik menggunakan umbi ganyong sebagai upaya pencegahan kanker usus besar, karena memiliki kandungan serat yang tinggi (Direktorat Gizi Depkes RI, 1989).

## METODE

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus galur Wistar. Sebanyak 30 ekor tikus diaklimatisasi selama 1 minggu, kemudian dibagi rata menjadi 5 kelompok secara random.

Tabel 1. Pembagian Kelompok Hewan Coba

Kelompok @ 6 ekor	Induksi AOM/DSS	Perlakuan Ganyong
Kontrol Negatif (KN)	-	-
Kontrol Positif (KP)	+	-
Perlakuan 1 (P1)	+	5%
Perlakuan 2 (P2)	+	10%
Perlakuan 3 (P3)	+	20%

### 1. Perlakuan ganyong

Tikus kelompok P1, P2, dan P3 secara berurutan diberi perlakuan tepung ganyong dengan persentase 5%, 10%, dan 20%. Tikus kelompok KN dan KP tidak diberi perlakuan tepung ganyong. Perlakuan diberikan dari minggu ke 2 hingga 17.

### 2. Penginduksian sel kanker

Tikus kelompok KP, P1, P2, dan P3 diinduksi dengan menggunakan AOM/DSS. Induksi kanker dilakukan pada minggu ke 4. Kadar AOM yang digunakan pada penelitian ini adalah 10 mg/kg berat badan kemudian didilusi dengan menggunakan *sterile isotonic solution* dengan perbandingan 1:10 sehingga diperoleh larutan AOM sebanyak 1 ml/injeksi. Injeksi larutan ini dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis tunggal. Satu minggu setelah injeksi AOM, diberikan DSS sebanyak 2 % dalam larutan air minum tikus, selama 7 hari berturut-turut.

### 3. Terminasi

Terminasi dilakukan pada minggu ke-18 setelah induksi AOM/DSS. Kemudian dilakukan nekropsi untuk mengambil jaringan usus besar. Sampel tersebut

kemudian diamati secara makroskopis untuk warna, ukuran usus besar (berat dan panjang) dan jumlah benjolan masing-masing tikus. Setelah nekropsi selesai jasad tikus akan ditampung dan dimusnahkan dengan insenerator.

### 4. Pengamatan histopatologi dan IHC Ki67

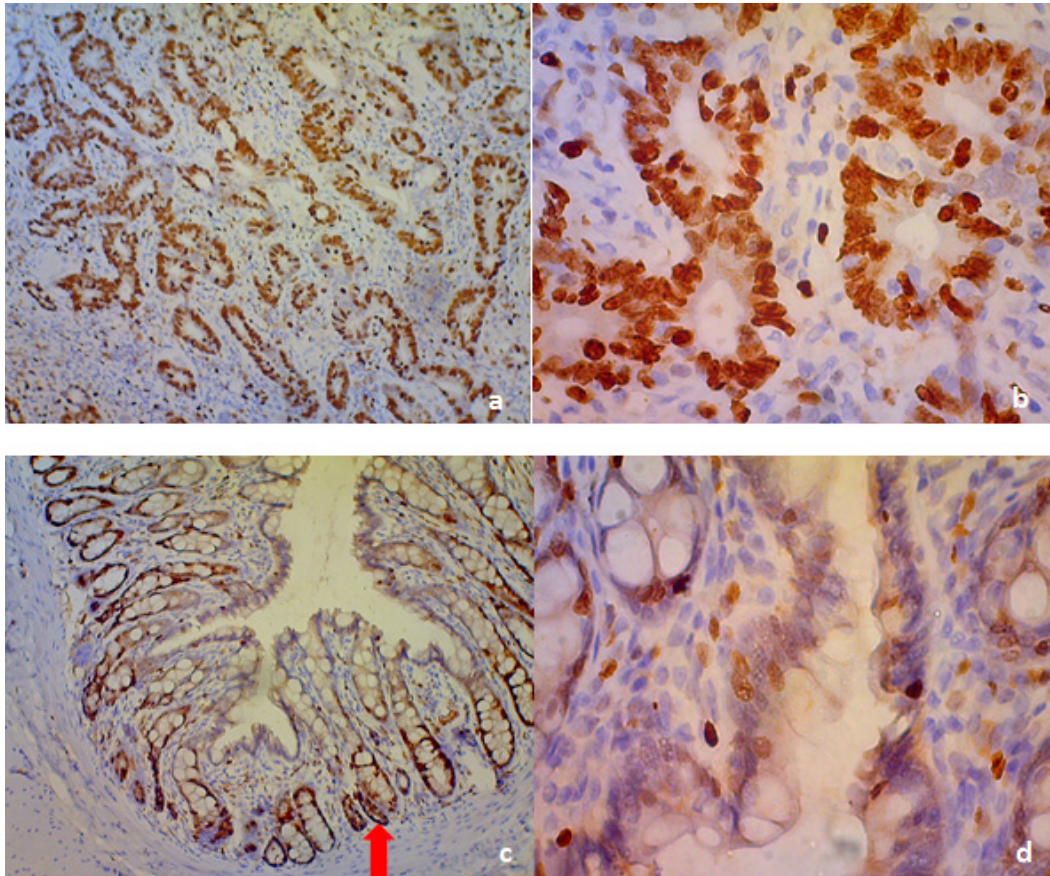
Penelitian ini menggunakan pewarnaan hematoxyline-eosin (HE) untuk pengamatan histopatologi. Hematoxylen yang digunakan adalah produk dari Nacalai no. katalog 175.01 dan *eosin*-nya juga berasal dari Nacalai no. katalog 14410.42. Pengamatan HE dilakukan untuk menegakkan diagnosis usus besar tikus. Diagnosis usus besar dikelompokkan dalam 4 kategori, yaitu: usus besar normal, kolitis, adenoma, dan adenokarsinoma. Pewarnaan Ki67 menggunakan anti- Ki67 dari Abcam, no katalog ab15580 dengan menggunakan metode imunohistokimia dan pengamatan menggunakan software Image J.

## HASIL DAN DISKUSI

Ekspresi Ki67 dinilai dengan cara menghitung prosentase jumlah sel positif terhadap jumlah seluruh sel pada satu bidang pandang. Mukosa dengan adenokarsinoma memiliki ekspresi

Ki67 tertinggi (gambar 1). Ekspresi Ki67 kelompok P1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok KP, sedangkan ekspresi Ki67 pada kelompok P2 dan P3 lebih tinggi dibandingkan kelompok KP. Analisis *one-way* ANOVA antar kelompok penelitian ini

berbeda bermakna (tabel 2), kemudian dilanjutkan analisis *post-hoc* LSD. Analisis *post-hoc* LSD menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok KN dengan semua kelompok induksi AOM/DSS (KP, P1, P2, dan P3) (tabel 3).



**Gambar 1.** Mukosa usus besar dengan pewarnaan IHC Ki67. a. Ekspresi Ki67 persentase tinggi pada mukosa adenokarsinoma (perbesaran 100X). b. Mukosa adenokarsinoma (perbesaran 400X). c. Ekspresi Ki67 pada mukosa normal menunjukkan positif pada basal kripta yang ditunjuk panah merah (perbesaran 100X). d. Ekspresi Ki67 persentase rendah pada mukosa normal (perbesaran 400X).

**Tabel 2.** Hasil Analisis Ekspresi Ki67

Kelompok	Rerata ± s.b.	<i>p</i>
KN	28,39 ± 5,19	0,000*
KP	55,68 ± 4,08	
P1	53,33 ± 3,24	
P2	60,64 ± 5,28	
P3	56,95 ± 1,59	

Keterangan : \*) nilai *p* bermakna dengan uji one way ANOVA.

**Tabel 3. Hasil Analisis *Post-Hoc* Lsd Ekspresi Ki67**

	Perbedaan rerata	Interval kepercayaan 95%		p
		Minimum	Maksimum	
KN vs KP	-27,283	-32,173	-22,393	0,000*
KN vs P1	-24,935	-29,825	-20,045	0,000*
KN vs P2	-32,250	-37,140	-27,360	0,000*
KN vs P3	-28,556	-33,447	-23,667	0,000*
KP vs P1	2,348	-2,542	7,238	0,332
KP vs P2	-4,967	-9,857	-0,077	0,047*
KP vs P3	-1,273	-6,163	3,617	0,596
P1 vs P2	-7,315	-12,205	-2,425	0,005*
P1 vs P3	-3,622	-8,512	1,268	0,140
P2 vs P3	3,693	-1,197	8,583	0,132

Keterangan : \*) nilai p bermakna ( $p < 0,05$ ) dengan *post-hoc* LSD.

Ekspresi Ki67 pada kelompok tanpa induksi AOM/DSS (KN) secara bermakna lebih rendah daripada kelompok yang diinduksi AOM/DSS (KP, P1, P2, dan P3). Hal ini menunjukkan bahwa induksi AOM/DSS akan meningkatkan proliferasi sel. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Shukla *et al.* (2016) juga memperlihatkan kepadatan Ki67 yang lebih tinggi secara bermakna pada kelompok yang diinduksi AOM/DSS dibandingkan kelompok kontrol, dengan menggunakan metode imunofluoresensi.

Data pada tabel 2 menunjukkan bahwa ekspresi Ki67 kelompok P1 lebih rendah dibandingkan kelompok KP meskipun tidak berbeda secara bermakna. Hal ini sejalan dengan hipotesis bahwa pemberian tepung ganyong menurunkan ekspresi Ki67 pada jaringan usus besar tikus model induksi AOM/DSS, meskipun penurunannya tidak berbeda bermakna. Ekspresi Ki67 kelompok P3 lebih tinggi daripada kelompok KP, namun tidak berbeda bermakna. Sedangkan ekspresi Ki67 pada kelompok P2 secara bermakna ( $p=0.047$ ) lebih tinggi dibandingkan KP, meskipun tidak ada satupun individu yang mengalami adenokarsinoma pada kelompok tersebut (tabel 2). Ekspresi Ki67 yang lebih tinggi pada kelompok P2 dan P3 dibandingkan kelompok KP ini mungkin disebabkan kurangnya asupan nutrisi terutama protein dan lemak pada tikus perlakuan. Pada penelitian ini, tikus pada kelompok KN dan KP diberi pakan AD2 (pakan yang biasa diberikan

pada tikus penelitian di UGM), sedangkan tikus pada kelompok P1, P2, dan P3 diberi pakan modifikasi AD2 dan ganyong. Pakan modifikasi AD2 dan ganyong dibuat dengan mengganti sejumlah AD2 dengan ganyong (contoh : untuk membuat pakan ganyong 10% sejumlah 1000 gram, maka diperlukan 900 gram AD2 dan 100 gram ganyong). Pakan modifikasi dimungkinkan memiliki kandungan protein dan lemak yang lebih rendah dibandingkan AD2, sehingga tikus mengalami malnutrisi, terutama pada kelompok P2 (perlakuan ganyong 10%) dan P3 (perlakuan ganyong 20%). Ditambah lagi tikus pada kelompok tersebut telah diinduksi AOM/DSS, yang menyebabkan tikus mengalami kondisi sakit (inflamasi dan tumorigenesis). Inflamasi meningkatkan kebutuhan energi basal sehingga saat kondisi inflamasi membutuhkan nutrisi yang lebih banyak dibandingkan saat kondisi sehat.

#### SIMPULAN DAN SARAN

Pemberian ganyong tidak menurunkan ekspresi Ki67 jaringan usus besar tikus tikus yang diinduksi AOM/DSS. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah waktu antara induksi dan terminasi diperpanjang (minimal 20 minggu), pemberian ganyong per sonde, dan pemberian ganyong dimulai tidak hanya 2 minggu sebelum induksi AOM, tetapi beberapa minggu sebelumnya (bertujuan untuk membiasakan sekaligus mencapai tahap prevensi).

## DAFTAR PUSTAKA

- Direktorat, Gizi Depkes RI 1989, *Daftar Komposisi Bahan Makanan*, Bharata, Jakarta.
- Globocan, 2012. *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.
- Robertis, M.D., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S, Cecchetelli, L., Signori, E., Fazio, V.M., 2011. The AOM/DSS murine model for the study of colon. *J Carcinog.* 10:9
- Shukla, P.K., Chaudhry, K.K., Mir, H., Gangwar, R., Yadav, N., Manda, B., Meena, A.S., and Rao, R.K., 2016. Chronic ethanol feeding promotes azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colonic tumorigenesis potentially by enhancing mucosal inflammation. *BMC Cancer.* 16:189. DOI 10.1186/s12885-016-2180-x.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., Mori, H., 2003. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94:965-73.
- Tanaka, T., Yasuia, Y., Tanaka, M., Oyama, T., Rahman, K.M.W., 2009. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. *Chemico-Biological Interactions.* 177: 128–136.
- Tanaka, T., 2012. Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model and Its Application for Research on Carcinogenesis and Chemoprevention. *Int J Inflamm.* Pp: 201-2.
- Urruticoechea, U., Smith, I.E., Dowsett, M., 2005. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol,* 23 : 7212 –7220.
- Uzma, N., Nagi, A.H., Waqas, S., 2008. Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. *J Ayub Med Coll Abbottabad .* 20(4).
- World, Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, 2011. *Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer.* New York, USA.