

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker kolorektal (KKR) merupakan penyebab kematian utama kedua dan keganasan ketiga yang paling umum di dunia. *Global burden* kanker kolorektal menunjukkan peningkatan signifikan hingga 60% dengan total kasus baru melebihi 2,2 juta kasus dan 1,1 juta kematian pada tahun 2030. WHO mencatat bahwa insiden rata-rata KKR pada pria dan wanita adalah 35,6 dan 22,6 per 100.000 populasi, dengan angka kematian mencapai 12,3 per 100.000 populasi (Arnold et al., 2017). Terjadi peningkatan cepat insiden KKR di beberapa negara Asia seperti Cina, Jepang, Korea, dan Singapura, sementara mortalitasnya cenderung menurun di negara-negara Barat namun meningkat di Asia. (Ng & Wong, 2013; Bray et al., 2018)

Di Indonesia, KKR menempati peringkat keempat dalam jenis kanker yang paling umum, dengan prevalensi 12,1 kasus per 100.000 penduduk. Kanker kolorektal termasuk dalam 10 besar kasus kanker di RS Kanker Dharmais selama 4 tahun terakhir. Perubahan pola hidup penduduk Indonesia telah berkontribusi pada peningkatan jumlah kasus baru dan kematian karena KKR. (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2015; Bray et al., 2018)

Studi epidemiologis dan observasi klinis menunjukkan bahwa inflamasi kronik memainkan peran penting dalam inisiasi dan promosi kanker. Kolitis ulseratif dan penyakit Crohn, yang merupakan bagian dari *inflammatory bowel disease* (IBD), meningkatkan risiko berkembangnya KKR, dengan faktor risiko

utama terkait dengan lama dan tingkat keparahan inflamasi serta mortalitas 15% sehingga memiliki prognosa yang lebih buruk dibanding tipe KKR (Bopanna et al., 2017, Sivamaruthi et al., 2020., Agraib et al., 2020, Hanahan & Weinberg, 2011, Han et al., 2016)

Kolitis ulseratif merupakan inflamasi kronik pada kolon yang timbul karena respon imun terhadap infeksi mikroba yang tidak tepat. Inflamasi merupakan respon yang normal terhadap infeksi dan trauma dimana netrofil dan makrofag menghasilkan sitokin inflamasi yang mengeliminasi patogen sehingga mengembalikan fungsi dan struktur normal. Kegagalan dalam penyembuhan inflamasi akut menyebabkan inflamasi kronik. Paparan inflamasi yang terus menerus pada *intestinal epithelial cells* (IECs) dan kerusakan sel yang hebat menyebabkan infiltrasi sel – sel imun sehingga menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) yang menyebabkan cedera jaringan dan kerusakan DNA, dimana akan mempromosikan proliferasi sel epitel sehingga menimbulkan mutasi genetik dengan mengaktifkan onkogen dan menginaktifkan *tumor suppressor gene*. Perubahan IECs secara genetik maupun sistem imun menghasilkan produk – produk yang mempengaruhi perkembangan dan progresivitas kanker (Frigerio et al., 2021; Vaghari-Tabari et al., 2022).

Infiltrasi limfosit menandakan hilangnya fungsi pertahanan mukosa usus dan menyebabkan infiltrasi mikroba ke dalam lamina propria, diikuti infiltrasi makrofag, neutrofil dan sel *natural killer* (NK) yang akan mengeliminasi patogen melalui sel epitel sehingga juga memicu reaksi inflamasi. Makrofag dan netrofil melepaskan *tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) yang menyebabkan kerusakan lebih lanjut terhadap pertahanan mukosa usus dan meningkatkan infiltrasi sel imun dan

sitokin proinflamasi ke lamina propria dengan cara menempel ke reseptor dan sel pretumor. *Tumour necrosis factor  $\alpha$*  meningkatkan pensinyalan *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) yang selanjutnya merangsang inflamasi, tumorigenesis, proliferasi dan survival sel pretumor. Faktor transkripsi seperti NF- $\kappa$ B dan *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) dan sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , interleukin 6 (IL-6), IL-1 menimbulkan imunitas bawaan dengan mempengaruhi sel epitel itu sendiri maupun ikut terlibat dalam onkogenesis. *nuclear factor kappa B* memainkan peran utama menghasilkan IL-6 dalam sel imun. Interleukin 6 memiliki efek pada sel epitel usus melalui IL-6 R dan mengaktifkan jalur pensinyalan *janus kinase* (JAK)-STAT, IL-6 juga memperkuat angiogenesis dengan merangsang ekspresi *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) pada permukaan sel tumor (Bopanna *et al.*, 2017; Zhen, 2018; Frigerio *et al.*, 2021; Vaghari-Tabari *et al.*, 2022).

Sel limfosit yang sudah berdiferensiasi menjadi CD4<sup>+</sup> dan CD 8<sup>+</sup> pada kolitis berinteraksi satu sama lain, sel CD 4<sup>+</sup> memainkan peran penting dalam patogenesis kolitis menjadi kanker dibagi menjadi dua grup yaitu sel efektor (*T helper 1* (Th 1) Th2 dan Th 17) dan sel regulator (*T reg*). Interferon  $\gamma$  dihasilkan oleh Th 1, sedangkan IL-17, IL-22 dan IL-21 disekresi oleh Th 17. Sel T regulator mengatur aktifitas sel T efektor dan toleransi imun tubuh serta menghasilkan sitokin seperti *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) yang biasanya sebagai sel anti inflamasi. *Transforming growth factor beta* memiliki peran ganda dalam inflamasi, selain merangsang diferensiasi sel Th 17 juga menghambat produksi sitokin inflamasi oleh makrofag dengan menghambat NF- $\kappa$ B, selain itu juga memiliki efek stimulasi pada diferensiasi sel T reg. *Transforming growth factor*

*beta* terutama mentransmisikan pesannya ke sel melalui SMAD sebagai faktor transkripsinya. Meskipun TGF- $\beta$  memiliki efek anti inflamasi dan dapat memberikan efek terhadap proliferasi sel sehingga menghambat IBD menjadi kanker, tampaknya sitokin ini juga memiliki peran dalam onkogenesis sehingga TGF- $\beta$  memiliki peran penting dalam *signaling pathway* dalam proliferasi sel, pertumbuhan, metastasis dan apoptosis. Ini terlihat pada perannya sebagai *tumor suppressor* pada stadium awal dan promotor pada stadium akhir. Onkogenesis pada KKRK (kanker kolorektal terkait kolitis) dimulai dari inflamasi dari epitel usus sampai menjadi displasia, yang akhirnya berubah menjadi kanker. Risiko terkena KKR setelah didiagnosa kolitis ulseratif adalah 0,02% setelah 10 tahun, 4,8% setelah 20 tahun dan 13,9% setelah 30 tahun (Bopanna *et al.*, 2017; Zhen, 2018; Frigerio *et al.*, 2021; Vaghari-Tabari *et al.*, 2022).

Dua jalur seluler dan molekuler diketahui menghubungkan inflamasi dan kanker: (1) jalur intrinsik, yang mana aktivasi onkogen akan meningkatkan ekspresi *inflammation-related protein* yang membentuk *inflammatory microenvironment*; (2) jalur ekstrinsik, kondisi inflamasi kronik mempromosikan perkembangan kanker. Penelitian-penelitian saat ini difokuskan pada sel inflamasi dan jalur inflamasi yang berperan dalam *microenvironment* tumor dan berperan penting dalam perkembangan dan progresivitas tumor (Andhika, 2015; Singh *et al.*, 2019).

*Azoxymethane* (AOM) dan dextran sulfat sodium (DSS) banyak digunakan pada hewan coba untuk mempelajari mekanisme yang mendasari terjadinya kanker kolorektal terkait kolitis pada manusia. *Azoxymethane* merupakan karsinogen yang kuat yang menyebabkan kanker kolorektal pada

hewan pengerat. Perkembangan kanker ini hampir mirip dengan pola yang terlihat pada manusia. Pemberian AOM intra peritoneal dosis tunggal diikuti 3 siklus DSS dapat menginduksi kanker kolorektal dari kolitis. Metode ini terbilang mudah, terutama pada hewan coba yang rentan, sehingga menjadi model yang berguna untuk penelitian kanker kolorektal. Pada tahun 2003, model AOM/DSS pertama kali dilaporkan 100% menimbulkan KKR pada kolon distal hewan coba (Li *et al.*, 2022). *Azoxymethane* menginduksi metilasi DNA dan mengaktifkan atau mutasi pada jalur kanker menyebabkan inisiasi tumorigenesis. Pemberian DSS menyebabkan overekspresi IL-6 dan TNF- $\alpha$  di usus besar. *Sphingosine kinase 1* (SphK1) yang mana diinduksi oleh TNF- $\alpha$ , mendorong jalur proinflamasi NF- $\kappa$ B/Stat3 untuk menginduksi peradangan dan mempromosikan tumorigenesis (Li *et al.*, 2022).

Komponen kunci *cancer promoting inflammation* meliputi beberapa faktor seperti kerusakan DNA, mutasi gen, sel imun, faktor transkripsi utama (NF- $\kappa$ B, STAT $\gamma$ ), sitokin proinflamasi (IL-6, COX-2, kemokin) dan faktor anti apoptosis, sehingga terapi target pada faktor-faktor tersebut akan menjadi terapi yang efektif untuk KKRK. COX-2 diinduksi oleh inflamasi dan diaktifkan oleh stimulus inflamasi seperti interleukin (IL)-1, interferon (IFN)- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ . Penelitian yang sebelumnya mendukung peran penting NF- $\kappa$ B dalam patogenesis kolitis dan kanker kolon dimana merupakan faktor transkripsi yang mengatur sistem imun, respons inflamasi, proliferasi sel, dan apoptosis. Pada mulanya diketahui bahwa NF- $\kappa$ B berfungsi untuk mengatur respons imun baik yang *innate* maupun *adaptive*, kemudian ditemukan juga berperan penting dalam proses inflamasi, bahkan dalam proses perkembangan inflamasi kronis menjadi kanker

(Karin & Greten, 2005; Ghosh & Hayden, 2008; Hirano *et al.*, 2020). Dari berbagai penelitian, pada kolitis dan kanker kolorektal ditemukan peningkatan aktivitas NF- $\kappa$ B, yang menunjukkan peranannya dalam patogenesis penyakit tersebut (Karin & Greten, 2005; Pasparakis, 2009; Wang *et al.*, 2009; Hirano *et al.*, 2020). Penelitian lainnya menunjukkan ekspresi IL-6 sangat mempengaruhi pertumbuhan tumor pada model KKRK, menunjukkan fungsinya sebagai faktor tropik bagi sel epitel neoplastik. Interleukin 6 memodulasi ekspresi kemokin dan molekul adhesi serta apoptosis, menekan infiltrasi neutrofil dan meningkatkan akumulasi leukosit mononuklear, dengan demikian mengatur resolusi inflamasi akut dan aktivasi imunitas adaptif. Pada studi klinis, kadar IL-6 dan IL-6R ditemukan tinggi dalam darah tepi penderita IBD, yang mana IL-6 meningkatkan akumulasi sel T di lamina propria kolon dengan menaikkan regulasi faktor antiapoptotik, yakni Bax, Bcl-2 dan Bcl-x1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi IL-6 dan STAT3 lebih tinggi pada penderita KU aktif dan KKRK, dibandingkan pada penderita KU yang tidak aktif dan penderita kontrol. Inflamasi kronik menghasilkan suatu *complex milieu* faktor pertumbuhan dan sitokin yang menyebabkan hiperplasia. Selain itu, sinyal TGF- $\beta$  juga merupakan salah satu jalur kunci yang berperan dalam KKRK ini, TGF- $\beta$  merupakan sitokin multifungsi yang penting dalam berbagai proses biologis, termasuk perkembangan, diferensiasi dan regulasi imun. Sinyal proliferasi dan antiapoptotik yang terjadi pada inflamasi kronik beraksi sinergis dengan kerusakan DNA dalam meningkatkan perkembangan kanker. Displasia merupakan manifestasi histologik paling dini yang ditemukan pada proses yang

menghubungkan inflamasi kronik dengan kanker (Karin & Greten, 2005; Pasparakis, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Etiologi kanker kolorektal sangat kompleks dan melibatkan antara faktor genetik dan lingkungan. Mikrobiota usus juga memiliki peran kunci dalam patogenesis KKR. *Dysbiosis*, perubahan pada komposisi mikrobiota memiliki peran penting dalam inisiasi, perkembangan, dan metastasis kanker kolorektal. (Coker *et al.*, 2019; Montalban-Arques & Scharl, 2019; Cheng *et al.*, 2020).

Multimodalitas terapi pada kanker kolorektal seperti pembedahan, kemoterapi dan radioterapi yang berkembang sekarang belum memberikan hasil yang memuaskan karena tingginya angka residif dan rendahnya survival. Modulasi mikrobiota usus dengan probiotik menjadi strategi yang menjanjikan dalam pencegahan dan pengobatan KKR.

Probiotik merupakan sekumpulan mikroba hidup yang terkandung dalam makanan dan bermanfaat terhadap kesehatan manusia. Efek ini terjadi karena probiotik memodulasi sistem pertahanan tubuh *host*, dampak langsung terhadap mikroorganisme lainnya baik komensal maupun patogen dan dampak terhadap produk mikroba seperti toksin serta produk yang berasal dari *host* seperti garam empedu dan hasil pencernaan makanan. Bakteri probiotik yang utama adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri ini beserta substansi probioaktif seluruhnya yang terkandung dalam probiotik bermanfaat terhadap saluran cerna dengan melepaskan berbagai enzim ke dalam lumen intestinal sehingga menghasilkan efek sinergi terhadap pencernaan, mengurangi gejala malabsorpsi dan anti kanker. Probiotik dari BAL biasa ditemukan dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*. Salah satu kanker yang diketahui dapat dihambat dengan

probiotik adalah kanker kolorektal dengan meningkatkan apoptosis, menurunkan proliferasi sel dan mengurangi inflamasi seperti penelitian pada pemberian *Lactobacillus plantarum* YY3, *Lactobacillus casei* BL23 dan *Lactobacillus coryniformis* MXJ32 pada model AOM/DSS (Drago, 2019; Yue *et al.*, 2020)

Efek menguntungkan dari probiotik sudah dikenal lebih dari 100 tahun yang lalu oleh *Metchnikoff*. Secara mekanisme, probiotik dapat mengurangi risiko kanker dengan beberapa efek, selain dengan modulasi jalur proliferasi dan apoptosis, probiotik juga memiliki keuntungan termasuk penghancuran karsinogen, mengurangi genotoksisitas mikroba, mengubah metabolit yang dihasilkan oleh mikrobiota, menghasilkan senyawa anti tumorigenik dan anti mutagenik, bersaing dengan bakteri patogen, meningkatkan barrier usus, serta meningkatkan respon imun bawaan dari host (Aindelis & Chlichlia, 2020).

Penelitian mengenai hubungan kanker dengan mikrobiota usus saat ini berkembang dengan pesat. Perubahan mikrobiota meningkatkan paparan sel imun saluran cerna terhadap *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) sehingga terjadi inflamasi yang akan mengaktifkan jalur tumorigenesis. Dengan terapi, mikrobiota usus pada manusia bisa dimanipulasi untuk mengontrol hal tersebut, contohnya dengan pemberian probiotik (Zaharuddin *et al.*, 2019).

Strain probiotik biasanya ditemukan dalam produk susu seperti yogurt dan keju atau digunakan sebagai suplemen makanan atau obat-obatan (Hasan & Yang, 2019; Berding *et al.*, 2021). Indonesia mempunyai kearifan lokal contohnya dadih yang merupakan susu fermentasi dari Sumatera Barat yang digunakan sebagai makanan keseharian masyarakat minang. Dadih berasal dari fermentasi alami susu kerbau (*yoghurt-like product*) dengan menggunakan tabung bambu

oleh mikroorganisme penghasil asam laktat yang secara alami terdapat pada susu kerbau tersebut (Wirawati *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian Sukma, yang meneliti dadih yang berasal dari 4 daerah lokal di Sumatera Barat yaitu Batusangkar, Alahan Panjang, Padang Panjang dan Agam menemukan bahwa susu fermentasi ini mengandung beberapa bakteri asam laktat terutama *Lactococcus* diikuti *Lactobacillus* dan *Leuconostoc* (Sukma *et al.*, 2018). Hal ini menjadi keunikan tersendiri dimana probiotik dari makanan tradisional di tempat lain lebih dominan mengandung *Lactobacillus*.

Probiotik, seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, menunjukkan efek anti kanker dengan mengatur jalur proliferasi, apoptosis, dan inflamasi. *Lactococcus lactis* juga mulai diminati untuk diteliti efek anti kankernya. Ada banyak asumsi bahwa *L. lactis* memiliki efek anti kanker dikarenakan karakternya yang mirip dengan *Lactobacillus*. Selain itu, *L. lactis* bersifat non-invasif dan non-patogenik sehingga aman dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama (Zhang *et al.*, 2016; Sharma, 2019; Kaczmarek *et al.*, 2021). *Lactococcus lactis* D4 merupakan salah satu galur dari *L. lactis* yang diisolasi dari dadih (Sukma *et al.*, 2018; Mills & Ross, 2011; Park *et al.*, 2021).

Pemberian obat lebih nyaman secara oral, tetapi terdapat beberapa keadaan yang tidak memungkinkan diberikan, baik kondisi klinis maupun dalam bidang farmasi. Kriteria pemilihan probiotik antara lain kemampuan adhesi, mempunyai kemampuan bertahan terhadap cairan lambung, asam dan cairan empedu oleh karena itu Pemberian terapi lokal bisa dipertimbangkan demi efektifitas terapi. Pemberian perrektal dapat menjadi alternatif yang bisa memiliki kelebihan karena bisa bekerja lokal dan sistemik. Lingkungan di rektum relatif

lebih konstan dan stabil dan memiliki aktifitas enzimatis yang rendah dibandingkan bagian lain di saluran cerna. Selain itu penggunaan obat perrektal dapat memintas siklus enterohepatik setelah penyerapan sistemik sehingga mengurangi efek samping obat–obat yang dimetabolisme di hati. Oleh karena itu, pemberian perrektal dapat meningkatkan efektifitas obat secara lokal dan sistemik. (Hua, 2019). Penelitian penggunaan *Butyrate enema* yang merupakan salah satu produk mikrobiota, didapatkan memiliki efek terapeutik pada kolitis, dan terbukti hampir 50% pasien mendapatkan keuntungan dimana inflamasi kolon berkurang sesudah irigasi lokal (Chauhan & Singh, 2019; Yu *et al.*, 2019).

Namun dalam prakteknya, masih sangat sedikit terapi kanker kolorektal yang dikaitkan dengan peranan mikrobiota usus apalagi yang diberikan secara lokal. Pada saat ini belum ada kajian khusus mengenai pengaruh *L. lactis* D4 yang di isolasi dari dadih terhadap imunologi dan penerapan klinisnya. Oleh karena itu, penulis ingin mengetahui efek pemberian *L. lactis* D4 hasil isolasi dadih yang diberikan perrektum terhadap kolitis yang berhubungan dengan KKR tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi AOM dan DSS.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan sebelumnya, maka dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ada pengaruh pemberian *L. lactis* D4 terhadap ekspresi TGF- $\beta$  pada kanker kolorektal terkait kolitis?
2. Apakah ada pengaruh pemberian *L. lactis* D4 terhadap ekspresi NF- $\kappa$ B pada kanker kolorektal terkait kolitis?

3. Apakah ada pengaruh pemberian *L. lactis* D4 terhadap ekspresi IL-6 pada kanker kolorektal terkait kolitis?
4. Apakah ada pengaruh pemberian *L. lactis* D4 terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada kanker kolorektal terkait kolitis?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis pengaruh pemberian *L. lactis* D4 terhadap ekspresi gen dari TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B, IL-6 dan TNF- $\alpha$  pada kanker kolorektal terkait kolitis.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis efek pemberian *L. lactis* D4 terhadap penurunan ekspresi gen TGF- $\beta$  pada kanker kolorektal terkait kolitis.
2. Menganalisis efek pemberian *L. lactis* D4 terhadap penurunan kadar ekspresi gen NF- $\kappa$ B pada kanker kolorektal terkait kolitis.
3. Menganalisis efek pemberian *L. lactis* D4 terhadap penurunan ekspresi gen IL-6 pada kanker kolorektal terkait kolitis.
4. Menganalisis efek pemberian *L. lactis* D4 terhadap penurunan ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada kanker kolorektal terkait kolitis.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Ilmu Pengetahuan

Sebagai bahan informasi ilmiah tentang efek pemberian *L. lactis* D4 terhadap ekspresi gen TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B, IL-6 dan TNF- $\alpha$  pada kanker kolorektal terkait kolitis.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi tambahan mengenai pemanfaatan *Lactococcus lactis* D4 perrektum yang diisolasi dari dadih pada tatalaksana kanker kolorektal terkait kolitis.
2. Menjadi landasan penelitian lanjutan pemanfaatan *L. lactis* D4 perrektum pada kanker kolorektal terkait kolitis pada manusia.
3. Memberikan informasi ilmiah tentang peranan *L. lactis* D4 sebagai probiotik dalam

