

## **Aktivitas Minyak Ikan dalam Menghambat Preneoplasia Kolon Mencit yang Diinduksi Azoksimetan dan Dextran Sodium Sulfate**

### **(Effect of Fish Oil in Inhibiting Colorectal Preneoplasia of Mice Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate)**

KUSMARDI<sup>1,3\*</sup>, BAMBANG PONTJO PRISOERYANTO<sup>2</sup>, EVA HARLINA<sup>2</sup>,  
SANTOSO CORNAIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Doktor, Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

<sup>3</sup>Laboratorium Imunopatologi, Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

Diterima 11 Mei 2014, Disetujui 18 Agustus 2014

**Abstrak:** Studi epidemiologi penggunaan suplemen minyak ikan dan pengaruhnya terhadap kanker kolon masih kontroversial. Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh minyak ikan dalam menghambat preneoplasia kolon mencit yang diinduksi azoksimetan (AOM) dan dextran sodium sulfate (DSS). Digunakan mencit Balb/C yang diinduksi dengan AOM 10 mg/kg BB yang dilanjutkan dengan pemberian minum DSS 1% selama seminggu. Pemberian minyak ikan dilakukan per oral dengan dosis 1,5, 3, dan 6 mg per mencit per hari. Pemeriksaan histopatologi terhadap jaringan kolon yang diwarnai hematoxilin-eosin dilakukan dengan menghitung jumlah fokus radang, hiperplasia, jumlah sel mitosis, dan skor displasia pada 10 lapang pandang. Penurunan jumlah fokus radang terjadi sejak bulan ke-2 dimana kelompok kontrol dan dosis rendah berbeda dengan dosis sedang dan tinggi ( $p < 0,05$ ). Sedangkan pada bulan ketiga dan keempat, penurunan jumlah fokus radang terjadi sejak dosis rendah, sedang dan tinggi ( $p < 0,01$ ). Jumlah sel epitel kript kolon mitosis mengalami penurunan mulai bulan kedua hingga keempat. Jumlah fokus sel epitel mukosa hiperplasia juga mengalami perbedaan pada bulan kedua. Pemberian minyak ikan juga menghambat terjadinya displasia yang terjadi sejak bulan keempat pada semua kelompok perlakuan, dan pada bulan ketiga pada kontrol.

**Kata kunci:** azoksimetan, displasi, hiperplasi, kanker kolorektal, mitosis, minyak ikan, radang.

**Abstract:** Epidemiologic studies of dietary marine n-3 fatty acids and risk of colorectal cancer have been inconsistent. The study was conducted to understand the inhibitory effect of fish oil in mice with colorectal preneoplasia induced by azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS). In this study, Balb/c mice was induced by AOM 10 mg/kg body weight followed by administration of 1 % DSS during a week. Fish oil administered orally at a dose of 1.5, 3, and 6 mg per day. Histopathological examination of the colon tissue (hematoxylin-eosin staining) was done by counting the number of inflammation, and hyperplasia foci, the number of mitosis epithelial cells, and the scores of dysplasia in ten visual fields. In the second month, decreasing in the number of inflammation foci occurred between the control and low dose groups with medium and high dose groups ( $p < 0,05$ ). While in the third and fourth month, decreasing in the number of inflammation foci were observed in all treatment group ( $p < 0.001$ ). The number of mitotic colonic crypt epithelial cells was statistically significant between control group and treatment groups, initially observed since the second month. In the second month to the fourth month, generally increasing of doses of fish oil has decreased the number of hyperplasia foci. Our research

\* Penulis korespondensi, Hp. 081319197444

e-mail: kusmardi.ms@ui.ac.id

indicates that fish oil also inhibits the occurrence of dysplasia. In the third and fourth month, dysplasia was found in the control group. Dysplasia was found only in the fourth month in the treatment group.

**Keywords:** azoxymethane, dysplasia, hyperplasia, colorectal cancer, fish oil, inflammation.

## PENDAHULUAN

*MARINE* n-3 fatty acids (MFA) merupakan komponen utama pada minyak ikan yang diduga berperan dalam menghambat karsinogenesis pada kanker kolorektal dengan cara menghambat *cyclooxygenase-2* (COX-2), meningkatkan kapasitas apoptosis, mengurangi angiogenesis, mengaktifkan protein kinase C (PKC). Melalui penelitian pada hewan coba dan penelitian ekologi diketahui bahwa MFA mengurangi risiko kanker kolorektal dan adenoma. Melalui penelitian uji klinis juga diketahui bahwa pemberian MFA mengurangi proliferasi sel. Akan tetapi beberapa penelitian epidemiologi memberikan hasil yang kurang konsisten antara konsumsi MFA dengan kanker kolorektal<sup>(1)</sup>. Dua studi prospektif dan satu studi kasus kontrol melaporkan tidak ada hubungan yang signifikan antara MFA dengan risiko kanker kolorektal, sedangkan satu studi kasus kontrol menunjukkan signifikansi antara variabel tersebut. Dalam suatu studi kasus kontrol, konsentrasi MFA dalam jaringan adiposa tidak berpengaruh pada penurunan risiko adenoma kolorektal<sup>(2,3)</sup>.

Dalam mempelajari karsinogenesis kanker kolorektal paling banyak digunakan induksi dengan 1,2 dimetilhidrazin (DMH) dan azoksimetan (AOM) dibandingkan dengan induksi menggunakan nitrosamin/heterosklik amin. Keuntungan yang diperoleh dari model yang diinduksi AOM adalah murah, karsinogen yang poten, nyaman, valid, well-appreciated dan digunakan luas<sup>(4)</sup>.

Sampai sekarang telah dilaporkan bahwa induksi AOM memberikan hasil sama dengan kanker kolorektal (KKR) sporadik manusia dalam hal terjadinya respon pada bahan promosi dan preventif. Model ini sudah banyak digunakan terutama dalam mengevaluasi bahan lingkungan, makanan, kemopreventif terhadap KKR. Model juga digunakan pada studi morfologi dan mekanisme molekular dalam karsinogenesis KKR<sup>(5,6)</sup>. Penelitian dilakukan untuk membuktikan pengaruh minyak ikan dalam karsinogenesis KKR menggunakan mencit yang diinduksi AOM dan dextran sodium sulfate (DSS). Penggunaan DSS dalam induksi bertujuan agar proses karsinogenesis KKR terjadi melalui jalur radang.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Mencit Balb/c jantan, minyak ikan (Scott<sup>TM</sup>),

AOM, *dextrane deoxy sulphate* (DSS), eter, formalin, parafin, hematoksin eosin (HE), alkohol absolut, 96%, dan 70%, litium karbonat, aquades.

**Alat.** Mikroskop cahaya, gelas obyek, kaca penutup, *sputt*.

**METODE. Hewan Coba.** Mencit Balb/c jantan berumur 5 minggu diperoleh dan diberikan perlakuan di Laboratorium Patologi Eksperimental, Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Hewan dipelihara dan diperlakukan sesuai *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* dari *Animal Care and Use Committee*, dan telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian FKUI. Mencit dipelihara pada kondisi temperatur terkontrol 23°C, kelembaban 55% dengan siklus 12 jam terang/gelap. Seluruh mencit diberi pakan standar dan minum air mineral *ad libitum*. Selain itu, pada kelompok uji diberikan minyak ikan komersial (Scott<sup>TM</sup>) dengan cara pencekokan dengan dosis 1,5, 3, dan 6 mg per mencit per hari.

**Induksi Kanker Kolon Dengan AOM dan DSS.** Induksi karsinogenesis kolon mencit dilakukan melalui injeksi intraperitoneal AOM yang dilarutkan dalam 0,9% NaCl dengan dosis 10 mg/kg berat badan sekali pemberian. Pasca induksi selama satu minggu mencit diberikan pakan standar dan minum air mineral. Selanjutnya selama satu minggu, minuman diganti dengan air mineral yang mengandung 1% DSS<sup>(7,8)</sup>. Protokol penelitian disajikan pada Gambar 1.

**Preparasi Sampel Jaringan.** Mencit dikorbankan dengan eter setelah 1, 2, 3, dan 4 bulan pascainduksi tumor dengan AOM. Kolon mencit diambil, sisa kotoran dibersihkan dari lumen kolon dengan membilas dengan air. Potongan jaringan difiksasi menggunakan buffer formalin.

**Pewarnaan HE.** Potongan jaringan kolorektal dibuat blok parafin. Blok parafin dibuat irisan setebal 4 µm dan direkatkan pada gelas obyek untuk pewarnaan HE dengan tahapan sebagai berikut. Sediaan dideparafinisasi dengan memakai xylol I-, II dan III, masing-masing 5 menit. Kemudian sediaan direhidrasi dengan memakai alkohol absolut, 96% dan 70% masing-masing selama 5 menit, dan dicuci di air mengalir selama 5 menit. Sediaan kemudian dimasukkan ke dalam Hematoksin (larutan Meyer) selama 7 menit, dan dibilas di air mengalir selama 10 menit. Setelah itu, sediaan dicelupkan ke dalam litium karbonat jenuh sebanyak 2-3 celup atau 1-2 menit direndam, dan dibilas dengan air mengalir selama 5

menit. Sediaan dikontrol apakah warna birunya sudah cukup, jika belum dimasukkan kembali ke larutan Meyer (hematoksin) selama 2 menit, lalu dibilas di air mengalir, direndam dalam eosin selama 1-2 menit., didehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 96%, dan absolut masing-masing selama 3 menit, *clearing* dengan xylol I - II - III, dan terakhir ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan kaca penutup. Sediaan dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x.

#### Interpretasi Pengamatan Histopatologi.

Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang dengan pembesaran 400x terhadap jaringan kolon mencit. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami mitosis, jumlah fokus hiperplasia. Selain itu jumlah fokus radang pada seluruh jaringan kolon dilakukan penghitungan. Sedangkan interpretasi displasia, dilakukan menggunakan sistem skor menurut Paulsen *et al.*, sebagai berikut: Skor 0: tidak ditemukan displasia; Skor 1 (displasia ringan): inti sel memanjang, agak padat, pseudostratifikasi, polaritas masih terjaga, sel goblet agak kurang; Skor 2 (displasia sedang): inti sel memanjang, lebih padat, lebih pseudostratifikasi, polaritas masih terjaga, sel goblet lebih sedikit; Skor 3 (displasia berat): Inti sel membesar, bulat atau oval dengan nukleoli, polaritas inti hilang, terdapat sejumlah mitosis, jumlah sel goblet mereduksi<sup>(9)</sup>.

**Analisis Data.** Untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak ikan terhadap berbagai variabel yaitu: radang, mitosis, hyperplasia dan dilakukan uji analisis variansi (anova).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Efek Pemberian Minyak Ikan Terhadap Terjadinya Peningkatan Berat Badan Mencit yang Diinduksi AOM dan DSS.** Efek pemberian minyak ikan terhadap berat badan mencit tercantum pada Tabel 1. Dari tabel tersebut terlihat bahwa indeks berat badan mencit semua dosis pada setiap bulan melewati 1, yang berarti bahwa pemberian minyak ikan menyebabkan peningkatan berat badan pada mencit yang dikorbankan setiap bulan. Indeks berat badan tertinggi dicapai oleh kelompok dosis tinggi yang

dikorbankan pada bulan ketiga yang mencapai 1,51, sedangkan indeks terendah (1,13) terjadi pada mencit yang memperoleh minyak ikan dosis rendah baik pada bulan pertama maupun kedua. Pada semua kelompok dosis pemberian minyak ikan, mulai bulan ketiga, memiliki indeks berat badan di atas 1,2.

Peningkatan berat badan pada kelompok kontrol yang terjadi pada bulan keempat merupakan suatu keadaan normal terjadi secara alamiah. Namun demikian, data yang dikumpulkan cukup menarik, dimana pada kelompok dosis sedang dan dosis tinggi, peningkatan berat badan terjadi lebih awal yaitu mulai bulan ketiga. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian minyak ikan pada mencit yang diinduksi untuk terjadinya proses pembentukan kanker, justru mengakibatkan peningkatan berat badan. Peningkatan berat badan berbanding lurus dengan kenaikan dosis minyak ikan pada mencit sekalipun diinduksi AOM dan DSS.

Telah diketahui bahwa ikan laut selain mengandung komposisi gizi yang tinggi seperti protein, vitamin dan mineral juga mengandung asam lemak tak jenuh omega-3. Asam lemak omega-3 dalam bentuk ekstrak minyak ikan atau konsentrasinya telah terbukti berpengaruh terhadap pencegahan dan penyembuhan berbagai penyakit, diantaranya penyakit jantung koroner.

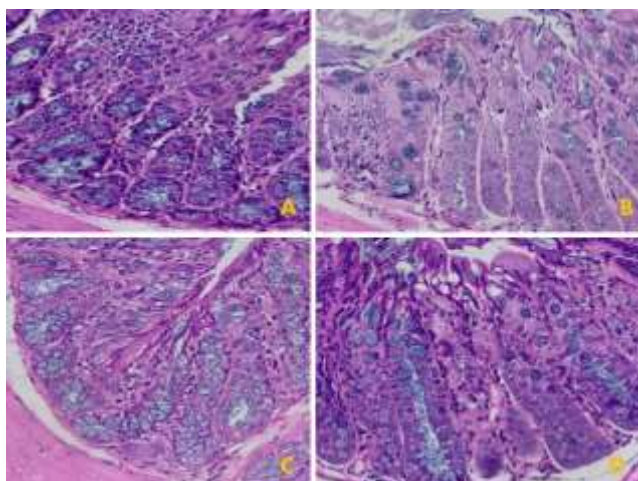
Minyak atau lemak terdiri dari unit-unit asam lemak, berdasarkan kejenuhannya asam lemak dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh. Perbedaan keduanya terletak pada ikatan kimianya, dimana asam lemak jenuh tidak memiliki ikatan rangkap. Perbedaan ini menyebabkan adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari kedua kelompok asam lemak tersebut.

Salah satu kelebihan dari lemak ikan adalah mengandung asam lemak tak jenuh yang relatif lebih banyak, terutama asam lemak tidak jenuh C20, C22, C24 daripada asam lemak jenuhnya. Lemak ikan mengandung 25% asam lemak jenuh dan 75% mengandung asam lemak tidak jenuh<sup>(1-3,10)</sup>. Asam-asam lemak alami yang termasuk asam lemak omega-3 adalah linoleat (C18: n-3), asam eikosapentaenoat atau EPA (C20:5, n-3) dan asam dekosahexaenoat atau DHA (C22:6, n-3), adapun yang lebih dominan dalam lemak ikan yaitu EPA dan DHA<sup>(1-3,10)</sup>. Dengan demikian, data kami menunjukkan bahwa terdapat peran minyak ikan dalam meningkatkan berat badan sekalipun diberikan pada mencit yang mengalami rangsangan untuk mengalami proses karsinogenesis.

**Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Terhadap Terjadinya Radang.** Radang pada jaringan mukosa kolon dari sediaan dengan pewarnaan hematoksin-eosin (HE) dilihat dengan pembesaran 400x

**Tabel 1. Indeks berat badan mencit kelompok perlakuan dengan minyak ikan terhadap kelompok kontrol setelah diinduksi AOM dan DSS.**

| Kelompok     | Bulan ke- |      |      |      |
|--------------|-----------|------|------|------|
|              | 1         | 2    | 3    | 4    |
| Dosis rendah | 1,13      | 1,13 | 1,23 | 1,26 |
| Dosis sedang | 1,15      | 1,16 | 1,23 | 1,35 |
| Dosis tinggi | 1,18      | 1,17 | 1,51 | 1,41 |



**Gambar 1.** Radang pada jaringan mukosa kolon mencit kelompok kontrol (A), kelompok dosis 1,5 mg/kg BB per hari (B), kelompok dosis 3 mg/kg BB per hari (C), kelompok 6 mg/kg BB per hari (D) pada bulan pertama (pewarnaan hematoksilin-eosin, pembesaran 40 x 10).

**Tabel 2.** Jumlah lokasi radang pada jaringan kolon mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan minyak ikan setelah diinduksi AOM dan DSS pada bulan pertama hingga keempat.

| Kelompok     | Bulan ke-               |                           |                         |                         |
|--------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
|              | 1                       | 2                         | 3                       | 4                       |
| Kontrol      | 7,00±0,37 <sup>b</sup>  | 7,33±0,21 <sup>b</sup>    | 7,50±0,22 <sup>b</sup>  | 7,17±0,31 <sup>b</sup>  |
| Dosis rendah | 7,33±0,33 <sup>bB</sup> | 6,83±0,40 <sup>abAB</sup> | 6,00±0,29 <sup>aA</sup> | 5,33±0,33 <sup>aA</sup> |
| Dosis sedang | 6,00±0,60 <sup>ab</sup> | 6,00±0,37 <sup>a</sup>    | 5,33±0,21 <sup>a</sup>  | 4,83±0,31 <sup>a</sup>  |
| Dosis tinggi | 5,00±0,37 <sup>a</sup>  | 5,83±0,48 <sup>a</sup>    | 5,17±0,31 <sup>a</sup>  | 4,50±0,22 <sup>a</sup>  |

Keterangan: Dosis rendah (1,5 mg/hari), dosis sedang (3 mg/hari), dosis tinggi (6 mg/hari). Huruf besar berbeda nyata dengan  $\alpha$  0,05 pada baris yang sama. Huruf kecil berbeda nyata dengan  $\alpha$  0,05 pada kolom yang sama.

ditampilkan pada Gambar 1, sedangkan jumlah lokasi (fokus) radang ditampilkan pada Tabel 2. Hasil uji anova yang digunakan untuk melihat adanya perbedaan jumlah lokasi radang antar kelompok (kontrol dan perlakuan) baik pada bulan pertama, kedua, ketiga dan keempat, ditunjukkan bahwa terdapat minimal satu kelompok yang berbeda dengan kelompok lainnya dengan nilai p secara berurutan adalah 0,004; 0,034; 0,000; dan 0,000. Uji lebih lanjut menggunakan *multiple comparison* Tukey menunjukkan bahwa pada bulan pertama terjadi perbedaan jumlah lokasi radang antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan baik dosis rendah dan sedang dengan kelompok pemberian minyak ikan dosis tinggi. Pada bulan kedua, penurunan jumlah lokasi radang terjadi antara kelompok kontrol dan dosis rendah dengan kelompok dosis sedang dan tinggi. Sedangkan pada bulan ketiga dan keempat, penurunan jumlah lokasi radang terjadi akibat pemberian minyak ikan dosis rendah, sedang dan tinggi. Dengan demikian data kami memberikan gambaran bahwa pemberian minyak ikan berakibat pada penurunan jumlah lokasi radang yang terjadi pada bulan ketiga dan keempat.

Bila dikaji lebih lanjut tentang perubahan jumlah lokasi radang dari setiap dosis pengujian menggunakan anova, diketahui bahwa pada jaringan

mukosa kolon yang diambil setiap bulan dari mencit yang diinduksi AOM dan DSS, kelompok kontrol tidak menunjukkan perbedaan jumlah lokasi radang ( $p=0,638$ ). Begitu juga kelompok pemberian dosis sedang dan tinggi yang tidak menunjukkan perbedaan jumlah lokasi radang ( $p=0,129$  dan  $0,098$ ). Hal yang menarik terjadi pada kelompok pemberian dosis rendah, dimana terjadi perbedaan yang bermakna pada jumlah lokasi radang dari jaringan mukosa kolon ( $p=0,002$ ). Uji *multiple comparison* Tukey, menunjukkan bahwa perbedaan terjadi pada kolon yang diambil pada bulan pertama dan kedua dengan ketiga dan keempat. Jumlah lokasi radang pada jaringan mukosa kolon mencit bulan ketiga dan keempat tersebut menunjukkan penurunan. Dengan demikian data kami menunjukkan bahwa pemberian minyak ikan pada encit yang diinduksi AOM dan DSS dalam proses karsinogenesis kolorektal, menyebabkan penurunan jumlah lokasi radang. Penurunan ini dicapai sejak bulan pertama dengan menggunakan dosis sedang dan tinggi. Sedangkan menggunakan dosis rendah, penurunan jumlah lokasi radang terjadi sejak bulan ketiga.

Pemberian AOM dan DSS dalam karsinogenesis kolorektal terjadi melalui terjadinya radang pada kolon. Dari penelitian yang dilakukan oleh Tanaka 2003,

dilaporkan 50% dari tikus yang diteliti mengalami radang pada kolon<sup>(6)</sup>. Penelitian lain yang melaporkan terjadinya radang pada hewan setelah pemberian AOM menunjukkan terjadinya radang yang hebat pada tikus yang juga ditandai oleh ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) yang makin tinggi<sup>(11,12)</sup>.

Dari data kami ditunjukkan bahwa pada kelompok kontrol dimana telah diinduksi AOM dan DSS, terjadi peradangan dengan jumlah lokasi paling besar dibandingkan kelompok perlakuan baik yang terjadi pada bulan pertama hingga bulan keempat pengambilan sampel jaringan kolon. Dengan makin ditingkatkannya dosis pemberian minyak ikan terhadap mencit yang telah diinduksi AOM dan DSS, makin mempercepat penurunan jumlah lokasi radang pada jaringan mukosa kolon mencit. Pada bulan pertama, penurunan jumlah lokasi radang terjadi pada pemberian dosis tinggi, pada bulan kedua penurunan terjadi dimulai dari pemberian dosis sedang. Sedangkan pada bulan ketiga dan keempat, penurunan jumlah lokasi radang jaringan mukosa kolon terjadi akibat pemberian dosis rendah. Jadi, dengan dosis rendah sekalipun, tetap terjadi penurunan jumlah lokasi radang, walaupun baru dicapai pada bulan ketiga.

Hal yang menarik yang telah disebutkan tadi adalah, bila dilihat dari perkembangan setiap bulannya dari setiap kelompok, hanya kelompok dosis rendah yang menunjukkan penurunan jumlah lokasi radang, yang terjadi pada bulan ketiga dan keempat. Hal ini terjadi karena pada pemberian dosis yang lebih besar (sedang dan tinggi), penurunan jumlah lokasi radang telah terjadi pada bulan sebelumnya yaitu sejak bulan pertama pada dosis tinggi dan sejak bulan kedua dari dosis sedang. Hal ini dapat dijelaskan karena kita ketahui dari deretan proses karsinogenesis, inisiasi terjadi akibat pemberian AOM, sedangkan progresi terjadi akibat pemberian DSS yang menyebabkan terjadinya radang sebagai proses yang mengakibatkan perubahan epigenetik. Peradangan sebagai proses progresi bermula sejak pemberian DSS yang dilakukan pemberian melalui air minum selama seminggu. Pada dosis rendah, penurunan peradangan masih terjadi, sedangkan pada dosis sedang dan tinggi sudah tidak terjadi peradangan karena mekanisme selanjutnya yang mengikuti proses progresi telah terjadi.

Pemberian minyak ikan menurunkan reaksi radang. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Garib yang melakukan pemberian minyak ikan secara parenteral<sup>(13)</sup>. Dari beberapa kepustakaan disebutkan bahwa minyak ikan yang merupakan anggota dari asam lemak memiliki potensi menurunkan derajat inflamasi pada *inflammatory bowel diseases* (IBD)<sup>(14,15)</sup>. Penelitian menggunakan mencit transgenik yang diberi pakan tambahan minyak

ikan, menghasilkan kesimpulan terjadi pengurangan terjadinya kolitis dibandingkan dengan pemberian pakan standar<sup>(16)</sup>. Dari semua penjelasan tersebut, menunjukkan penelitian yang telah dilakukan menguatkan efek pemberian minyak ikan terhadap karsinogenesis kolorektal melalui jalur peradangan atau inflamasi.

Dilaporkan bahwa perubahan dari asam linoleat (LA) menjadi asam arakhidonat (AA) dihambat oleh EPA, DHA dan ALA yang terkandung dalam minyak ikan. AA berkompetisi dengan EPA merupakan substrat dari enzim siklooksigenase (COX-2) dalam pembentukan prostaglandin dan tromboksan, dan substrat dari enzim lipooksigenase (LOX) menghasilkan leukotrin. Prostaglandin, tromboksan dan leukotrin merupakan protein yang berperan dalam reaksi radang dan proliferasi, namun ketiga protein tersebut yang dihasilkan/ turunan EPA kurang memiliki kemampuan dalam merangsang reaksi radang dan proliferasi. Selain itu EPA dan DHA memiliki kemampuan menghambat produksi COX-2 sehingga menghambat produksi ketiga protein proinflamasi dan proproliferasi tersebut. Telah diketahui bahwa reaksi radang dan proliferasi berhubungan dengan terjadinya tumor<sup>(10)</sup>.

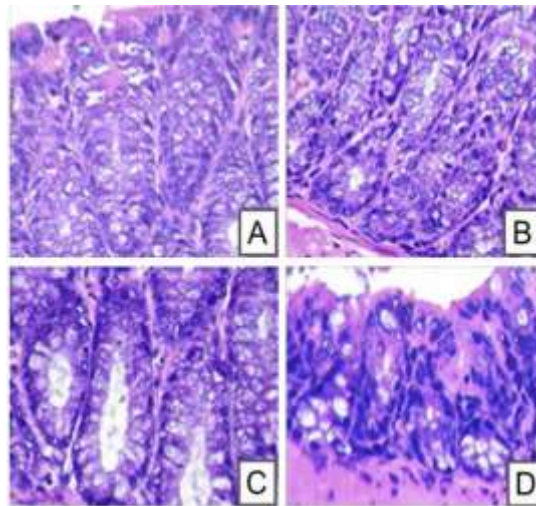
Minyak ikan dapat mempengaruhi sel yang berperan dalam reaksi radang melalui berbagai mekanisme, yaitu: mempengaruhi kompleks lipid, lipoprotein, hormon dan metabolit yang berperan dalam reaksi radang. Kandungan *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) yang terdapat pada minyak ikan berpengaruh langsung terhadap sel radang melalui reseptor asam lemak yang terdapat pada permukaan sel maupun intraseluler yang nantinya berpengaruh pada faktor transkripsi seperti *peroxisome proliferator activated receptors* (PPARs). Selain itu, PUFA dapat dioksidasi melalui proses enzimatik maupun nonenzimatik yang derifatnya bekerja langsung pada reseptor permukaan sel radang<sup>(17,18)</sup>.

**Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Terhadap Mitosis, Hiperplasia, dan Displasia Sel Epitel Kripta Jaringan Mukosa Kolon.** Sel epitel kripta jaringan mukosa kolon yang mengalami mitosis pada sediaan dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dilihat dengan pembesaran 400x. Pengamatan pada sepuluh lapang pandang dilakukan untuk menghitung jumlah seluruh sel epitel yang mengalami mitosis. Tabel 3 menunjukkan mitosis sel epitel kripta kolon mencit kelompok kontrol dan perlakuan. Setiap bulan dari sediaan mukosa kolon, terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami mitosis pada kelompok perlakuan. Penurunan terjadi sesuai dengan peningkatan dosis minyak ikan yang diberikan pada mencit yang diinduksi AOM dan DSS.

**Tabel 3. Jumlah lokasi sel epitel kripta yang mengalami hiperplasia dan jumlah sel yang mengalami mitosis jaringan kolon.**

| Kelompok           | Bulan ke-                |                           |                          |                          |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                    | 1                        | 2                         | 3                        | 4                        |
| <b>Hiperplasia</b> |                          |                           |                          |                          |
| Kontrol            | 10,33±1,73 <sup>ba</sup> | 13,83±1,47 <sup>baB</sup> | 16,50±1,55 <sup>bb</sup> | 15,17±1,72 <sup>cb</sup> |
| Dosis rendah       | 9,83±1,74 <sup>b</sup>   | 6,83±1,14 <sup>a</sup>    | 6,17±0,95 <sup>a</sup>   | 7,50±0,62 <sup>b</sup>   |
| Dosis sedang       | 7,00±2,33 <sup>a</sup>   | 5,67±0,92 <sup>a</sup>    | 4,67±0,50 <sup>a</sup>   | 4,50±0,99 <sup>a</sup>   |
| Dosis tinggi       | 7,50±1,40 <sup>a</sup>   | 5,83±1,01 <sup>a</sup>    | 5,83±0,70 <sup>a</sup>   | 3,83±1,42 <sup>a</sup>   |
| <b>Mitosis</b>     |                          |                           |                          |                          |
| Kontrol            | 8,29±2,05 <sup>ba</sup>  | 17,83±1,88 <sup>bb</sup>  | 17,33±1,82 <sup>cb</sup> | 18,67±1,44 <sup>cb</sup> |
| Dosis rendah       | 8,83±1,27 <sup>b</sup>   | 9,50±1,97 <sup>a</sup>    | 8,13±0,67 <sup>b</sup>   | 10,25±1,02 <sup>b</sup>  |
| Dosis sedang       | 5,79±1,83 <sup>a</sup>   | 6,17±1,27 <sup>a</sup>    | 4,50±0,53 <sup>a</sup>   | 6,38±1,58 <sup>a</sup>   |
| Dosis tinggi       | 3,38±0,78 <sup>a</sup>   | 5,67±1,09 <sup>a</sup>    | 4,88±0,92 <sup>a</sup>   | 4,79±1,09 <sup>a</sup>   |

Dosis rendah (1,5 mg/hari), dosis sedang (3 mg/hari), dosis tinggi (6 mg/hari). Huruf besar berbeda nyata dengan  $\alpha$  0,05 pada baris yang sama. Huruf kecil berbeda nyata dengan  $\alpha$  0,05 pada kolom yang sama.



**Gambar 2. Gambaran mikroskopis jaringan kolon mencit yang tidak mengalami displasia (A), displasia skor 1 (B) dengan inti sel memanjang, inti lebih padat, terdapat pseudostratifikasi; displasia skor 2 (C) dengan inti sel memanjang, lebih padat, terdapat stratifikasi sel epitel, displasia skor 3 (D) dengan inti memanjang, polaritas inti tidak jelas, sel goblet jauh berkurang (pembesaran 400 x, pewarnaan HE).**

Dari hasil pengujian dengan anova 2 arah ditemukan perbedaan mitosis pada minimal satu kelompok perlakuan dosis minyak ikan pada mencit yang diinduksi AOM dan DSS ( $p=0,000$ ) namun tidak diberikan minyak ikan. Melalui uji *multiple comparison* Tukey, pada kelompok kontrol diketahui bahwa perbedaan terjadi antara bulan pertama dengan bulan-bulan selanjutnya. Pada bulan kedua dan selanjutnya terjadi peningkatan jumlah sel epitel kripta yang mengalami mitosis. Peningkatan jumlah sel yang mengalami mitosis ini makin tinggi seiring lamanya waktu pengambilan sampel jaringan kolon mencit.

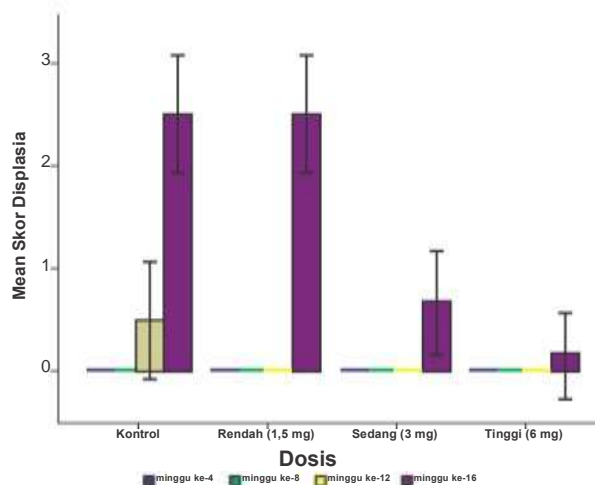
Berbeda dengan kelompok kontrol, kelompok perlakuan baik dosis rendah, sedang maupun tinggi, tidak menunjukkan perbedaan bermakna walaupun tampaknya terjadi kecenderungan peningkatan jumlah sel epitel yang mengalami mitosis ( $p=0,703$  untuk dosis rendah;  $0,697$  untuk dosis sedang dan  $0,427$  untuk dosis tinggi).

Bila dilakukan perbandingan antara kelompok kontrol dan perlakuan, pada bulan pertama tidak

terdapat perbedaan bermakna jumlah sel epitel kripta kolon yang mengalami mitosis. Perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan terjadi mulai pada bulan kedua ( $p=0,00$ ), ketiga ( $p=0,000$ ) dan keempat ( $p=0,000$ ).

Dari Tabel 3 juga dapat dilihat adanya perbedaan bermakna jumlah sel yang mengalami hiperplasia terjadinya sel epitel kripta jaringan mukosa kolon mencit antara kelompok kontrol dan perlakuan pada bulan kedua, ketiga dan keempat ( $p=0,000$ ). Pada bulan pertama tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna sel epitel mukosa kolon yang mengalami hiperplasia. Pada bulan kedua hingga keempat, umumnya peningkatan dosis pemberian minyak ikan terhadap mencit yang diinduksi AOM dan DSS mengalami penurunan jumlah lokasi sel yang terjadi hiperplasia.

Displasia pada jaringan kolon mencit hanya dijumpai pada bulan ketiga dan keempat (Gambar 2). Di bulan ketiga, displasia mulai ditemukan pada mencit kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok



**Gambar 3.** Rerata skor displasia pada sel epitel kript kolon kelompok kontrol dan pemberian minyak ikan.

perlakuan ditemukan hanya pada bulan keempat. Hasil tersebut mendukung penelitian sebelumnya yang menghasilkan kesimpulan bahwa pemberian asam lemak yang terdapat pada minyak ikan pada mencit yang diinduksi terjadinya kanker kolon pada mencit, memiliki efek penghambatan<sup>(15)</sup>. Penelitian lain menggunakan 1,2-dimethylhydrazine dalam menginduksi terjadinya kanker kolorektal pada tikus juga memberikan hasil penurunan mitosis sel epitel kript kolon dan meningkatkan apoptosis sel epitel kript setelah pemberian pakan n-3 PUFA<sup>(19)</sup>.

Hiperplasia merupakan tahap awal perubahan sel menjadi kanker. Hiperplasia merupakan pertumbuhan yang meningkat yang terjadi pada sel yang memiliki kemampuan mengalami proliferasi tinggi. Biasanya hiperplasia dikaitkan dengan peningkatan proliferasi dan kecepatan mitosis. Dengan meningkatnya jumlah sel yang mengalami hiperplasia, ditentukan bahwa proliferasi berjalan lebih dari biasanya. Beberapa penelitian mengaitkan bahwa hiperplasia merupakan awal terjadinya displasia, walaupun tidak selamanya hiperplasia akan menghasilkan displasia. Data kami menunjukkan bahwa, pemberian minyak ikan pada mencit yang diinduksi AOM dan DSS, menurunkan jumlah sel yang mengalami mitosis, menurunkan jumlah lokasi yang mengalami hiperplasia. Selain itu terjadinya displasia yang merupakan lesi preneoplasia yang dijumpai pada bulan ketiga pada kelompok kontrol, terjadi mulai bulan keempat pada semua kelompok pemberian minyak ikan. Namun walaupun demikian, peningkatan dosis menurunkan rerata skor displasia pada jaringan kolon (Gambar 3). Sebagaimana penelitian terdahulu yang lain, penelitian yang dilakukan ini menggunakan kontrol negatif yaitu mencit yang diinduksi karsinogen, namun tidak menggunakan kontrol positif karena mekanisme penghambatan omega-3 pada minyak ikan melalui berbagai jalan, di antaranya melalui penghambatan

pembentukan protein yang berhubungan dengan radang, penghambatan melalui berbagai proses epigenetik yang memerlukan banyak kelompok kontrol positif.

## SIMPULAN

Semua kelompok mencit yang diinduksi AOM/DSS dan diberi minyak ikan menunjukkan peningkatan berat badan sejalan dengan peningkatan dosis minyak ikan. Pada bulan pertama terjadi perbedaan jumlah lokasi radang, pada bulan kedua terjadi penurunan jumlah lokasi radang antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan baik dosis rendah dan sedang dengan kelompok pemberian minyak ikan dosis tinggi. Pemberian minyak ikan pada mencit yang diinduksi AOM/DSS menyebabkan penurunan jumlah lokasi radang oleh dosis rendah pada bulan ketiga, dosis sedang pada bulan kedua dan dosis tinggi pada bulan pertama. Jumlah sel epitel kript kolon yang mengalami mitosis pada kelompok kontrol dan perlakuan mengalami perbedaan bermakna pada bulan kedua, ketiga dan keempat. Demikian pula dengan sel epitel mukosa kolon yang mengalami hiperplasia pada kelompok kontrol dan perlakuan, mengalami penurunan dan perbedaan bermakna pada minggu kedua hingga keempat. Pemberian minyak ikan juga menghambat terjadinya displasia pada mencit yang diinduksi AOM. Pada minggu ketiga, mencit kelompok perlakuan, mengalami penurunan displasia seiring dengan peningkatan dosis minyak ikan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Reddy BS. Mini Review: Omega-3 fatty acid in colorectal cancer prevention. *Int J Cancer*. 2004.112:1-7.
2. Butler LM, Wang R, Koh W-P, Stern MC, Yuan J-M,

- Yu MC. Marine n-3 and saturated fatty acids in relation to risk of colorectal cancer in Singapore Chinese: A prospective study. *Int J Cancer*. 2009.124(3):678-86.
3. Daniel CR, McCullough ML, Patel RC, Jacobs EJ, Flanders WD, Thun MJ, Calle EE. Dietary intake of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a Prospective cohort of U.S. men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009.18(2):516-25.
  4. Suzuki R, Miyamoto S, Yasui Y, Sugie S, Tanaka T. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer*. 2007.7:84-7.
  5. Massagué J. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell*. 2008.134(2):215-30.
  6. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009.30(2):183-96.
  7. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*. 2006.27:162-9.
  8. Tanaka T, Kohno H, Susuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 2003.94: 965-73.
  9. Paulsen JA, Loberg EM, Olstorn HB, Knutsen H, Steffensen I-L, Alexander J. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethan-treated rat. *Cancer Res*. 2005.65: 21-129.
  10. Calder FC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrient*. 2010.355(2):355-74.
  11. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*. 2006.49(4):406-10.
  12. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the DSS mouse colitis model. *Carcinogenesis*. 2000.21:757-68.
  13. Garib R, Garla P, Torrinhas RS, Bertevello P, Logullo AF, Waitzberg DL. Effects of parenteral fish oil lipid emulsions on colon morphology and cytokine Expression after experimental colitis. *Nutr Hosp*. 2013.28(3):849-56.
  14. Calder PC. Fatty acid and immune function: Relevance to inflammatory bowel diseases. *Int Rev Immunol*. 2009.28:506-34.
  15. Chapkin RS, Seo J, McMurray DN, Lupton JR. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem Phys Lipids*. 2008.153:14-23.
  16. Jia Q, Lupton JR, Smith R, Weeks BR, Callaway E, Davidson LA, Kim W, Fan YY, Yang P, Newman RA, Kang JX, McMurray DN, Chapkin RS. Reduced colitis-associated colon cancer in Fat-1 (n-3 fatty acid desaturase) transgenic mice. *Cancer Res*. 2008.68:3985-91.
  17. Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Chu A, Helton S. Fish oil modulates macrophage P44/P42 mitogen-activated protein kinase activity induced by lipopolysaccharide. *JPEN*. 2000.24:159-63.
  18. Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta*. 2005.1756(2):83-96.
  19. Latham P, Elizabeth K, Lund T, Ian T. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis*. 1999.20(4):645-50.