



HEWAN MODEL UJI *IN VIVO* ANTIKANKER : REVIEW ARTIKEL

Suswiantoro Vicko¹, Ardiansyah², Tri Arifah³

¹ *Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Aisyah Pringsewu, Lampung, Indonesia.*

² *Laboratorium Teknologi Farmasi, Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Aisyah Pringsewu.*

³ *Mahasiswa Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Aisyah Pringsewu, Lampung, Indonesia*

Penulis Korespondensi : vickosuswiantoro@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang : Kanker adalah kumpulan lebih dari 100 penyakit yang saling berhubungan dan disebabkan oleh mutasi genetik maupun paparan lingkungan. Kanker dikarakterisasi dengan pertumbuhan tidak terkendali, proliferasi, dan penyebaran sel abnormal. Penyakit ini melibatkan bermacam-macam perubahan genetik dan epigenetik, terutama pada gen-gen yang terlibat dalam control pertumbuhan dan pembelahan sel. Perkembangan kanker disebut dengan karsinogenesis. Perkembangan ini bersifat lama, transformasi yang bersifat multistep dari sel normal menjadi sel yang ganas serta meliputi tahan inisiasi, promosi, dan progresi. Interaksinya juga rumit dan tidak hanya melibatkan sel yang bermutasi tetapi juga interaksinya dengan lingkungan sekitar. Metode : Melakukan pencarian di PubMed (selama 2001-2021), penelitian terakhir dilakukan pada Desember 2001; situs web yang relevan; dan pemindaian daftar referensi artikel yang relevan. Tidak ada batasan bahasa atau publikasi. Pencarian kata kunci dalam MeSH (judul subjek medis) “*Animals model for anticancer*”. Hasil : Didapatkan terdapat hewan model untuk pengujian anti kanker yaitu *Spontaneous tumor models, Transplantable tumor models, Experimentally induced tumors models (Virus induced, Radiation induced, Chemically induced)*, dan *Genetically Engineered Models*

Kata kunci : Hewan model, Kanker, Tikus, In Vivo.

ABSTRACT

Background : Cancer is a collection of more than 100 diseases that are interconnected and caused by genetic mutations and environmental exposures. Cancer is characterized by uncontrolled growth, proliferation and spread of abnormal cells. This disease involves a variety of genetic and epigenetic changes, especially in the genes involved in the control of growth and cell division. The development of cancer is called carcinogenesis. This development is a long, multistep transformation from normal cells to malignant cells and includes stages of initiation, promotion, and progression. The interactions are also complex and involve not only the mutated cell but also its interaction with the surrounding environment. Methods: Conducted a search on PubMed (during 2001-2021), the last study was conducted in December 2001; relevant websites; and scanning of relevant article reference lists. There are no language or publication restrictions. Keyword search in MeSH (medical subject title) “Animals model for anticancer”. Results: There were animal models for anti-cancer testing, namely Spontaneous tumor models, Transplantable tumor models, Experimentally induced tumors models (Virus induced, Radiation induced Chemically induced), and Genetically Engineered Models

Keyword : Animal model, cancer, rat, In vivo.

PENDAHULUAN

Kanker adalah kumpulan lebih dari 100 penyakit yang saling berhubungan dan disebabkan oleh mutasi genetik maupun paparan lingkungan. Kanker dikarakterisasi dengan pertumbuhan tidak terkendali, proliferasi, dan penyebaran sel abnormal. Penyakit ini melibatkan bermacam-macam perubahan genetik dan epigenetik, terutama pada gen-gen yang terlibat dalam control pertumbuhan dan pembelahan sel. Perkembangan kanker disebut dengan karsinogenesis. Perkembangan ini bersifat lama, transformasi yang bersifat multistep dari sel normal menjadi sel yang ganas serta meliputi tahanan inisiasi, promosi, dan progresi. Interaksinya juga rumit dan tidak hanya melibatkan sel yang bermutasi tetapi juga interaksinya dengan lingkungan sekitar (Ruggeri, B. A., et al., (2014))

Karsinogen adalah suatu agen yang dapat meningkatkan insiden terjadinya tumor (neoplasms) dibandingkan dengan insiden pada kontrol yang tepat di organisme uji yang didefinisikan. Karsinogen dapat menyebabkan kanker melalui mekanisme genotoksik dan non genotoksik. Mekanisme genotoksik antara lain terbentuknya *DNA adducts* dan perubahan pada kromosom yang menyebabkan ternyadinya kerusakan genetis. Sementara peristiwa non genotoksik antara

lain memicu inflamasi, immunosupresi, meningkatnya ROS (Reactive Oxygen Species), Reactive Nitrogen Species, dan perubahan epigenetik yang menyebabkan perubahan pada transduksi sinyal (Derelanko, M. 7 Auletta, C. 2014). Hal ini menyebabkan kondisi instabilitas genetik yang menyebabkan proliferasi yang tidak terkontrol dan luput dari apoptosis. Hal ini dalam jangka waktu lama akan menimbulkan kanker.

Proses karsinogenesis terjadi dalam beberapa fase utama, yaitu:

1. Inisiasi

Langkah-langkah kritis berikut ini terlibat dalam proses inisiasi oleh bahan kimia karsinogenik, yaitu:

- a. konversi bahan kimia menjadi metabolit reaktif-DNA (karsinogenik utama),
- b. interaksi karsinogenik dengan DNA, yang menyebabkan perubahan struktur DNA,
- c. perbaikan DNA yang dapat mengembalikan kerusakan struktural, dan
- d. proliferasi sel yang mengarah pada fiksasi kerusakan DNA.

Proses inisiasi tanpa proses promosi dan progresi, jarang menghasilkan

neoplasma yang bersifat ganas. Apabila pada proses ini terjadi mutasi pada gen protooncogen / onkogen dan gen penekan tumor, maka perubahan ini dapat memicu transformasi neoplastik. Inaktivasi gen penekan tumor p53 melalui mutasi titik (*point mutation*) merupakan mekanisme dalam induksi kanker oleh berbagai agen, termasuk benzo(a)pyrene dan aflatoxin B1. Mutasi pada p53 adalah mutasi gen yang paling sering ditemukan pada kanker manusia.

2. Promosi

Promosi mengacu pada fenomena aktivasi gen dimana perubahan fenotipe laten pada sel yang mengalami proses inisiasi kemudian diekspresikan melalui seleksi dan ekspansi klon. Agen yang mampu menginduksi tumor disebut sebagai tumor promotor. Contohnya adalah Tetradekanoyl phorbol acetate (TPA), fenobarbital, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), dan asam kolat (cholic acid).

Tumor promotor tidak berinteraksi langsung dengan DNA, namun tergantung pada perubahan ekspresi gen. Aktivitas paling penting dari

promotor tumor adalah stimulasi mitogenik. Untuk memberikan efek mempromosikan tumor, tergantung pada konsentrasi paparan karsinogen dan stimulasi tumor promotor harus berlangsung terus-menerus dalam jangka waktu lama di jaringan target. Tidak semua sel yang terpapar tumor promotor mengalami tahap promosi, dan hanya sel yang distimulasi untuk membelah dan melarikan diri dari apoptosis yang akan melanjutkan ke langkah berikutnya, yaitu "progresi".

3. Progresi

Langkah terakhir dari proses karsinogenesis adalah transformasi preneoplasma dan/ atau neoplasma jinak menjadi ganas. Selama tahap progresi, fenotip neoplastik ganas diperoleh melalui mekanisme genetik dan epigenetik.

Agen yang hanya menyebabkan transisi sel dari tahap promosi ke tahap progresi disebut agen progresor. Contohnya adalah hidrogen peroksida, garam arsenik, hidroksiurea, dan peroksida organik, seperti benzoil peroksida.

Agen progresor ini mungkin memiliki kemampuan untuk menginduksi penyimpangan kromosom dan dalam

beberapa kasus, meningkatkan klastogenesis yang terkait dengan ketidakstabilan kariotipe yang berkembang. Hal ini menimbulkan gangguan pada proses mitosis, fungsi telomerase yang tidak teratur, perubahan status metilasi DNA, rekombinasi DNA, amplifikasi gen, dan transposisi gen. Sel dalam tahap progresi dapat memperoleh kemampuan untuk menjalani invasi dan metastasis untuk akhirnya mengarah pada pembentukan kanker.

METODE

Melakukan pencarian di PubMed (selama 2001-2021), penelitian terakhir dilakukan pada Desember 2001; situs web yang relevan; dan pemindaian daftar referensi artikel yang relevan. Tidak ada batasan bahasa atau publikasi. Pencarian kata kunci dalam MeSH (judul subjek medis) “*Animals model for anticancer*” dilakukan terlebih dahulu. Kemudian, kami mencoba untuk mengklasifikasikan semua data yang berkaitan dengan efek farmakologis pada

animal models, penginduksi mekanisme hewan yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Model Hewan untuk Kanker

Secara umum dapat dibagi menjadi (Chavan, A., & Universiy, P. (2014), Kemp, C. J. (2015):

1. *Spontaneous tumor models*
2. *Transplantable tumor models*
3. *Experimentally induced tumors models*
 - Virus induced*
 - Radiation induced*
 - Chemically induced*
4. *Genetically Engineered Models*

Spontaneous tumor models

Pada model ini diperlukan seleksi dan penggunaan hewan dengan insidensi kanker secara alami. Tipe kanker dalam model ini sangat spesifik terhadap species, keturunan, dan strain. Model ini digunakan jika tumor spontan mirip dengan tumor yang terjadi pada manusia dimana memiliki gejala, progresi, karakteristik morfologis, etiologi dan respon terapi yang mirip. Tumor harus terjadi pada frekuensi yang cukup banyak

agar mungkin untuk dilakukan dan ekonomis.

Contoh hewan yang dapat digunakan adalah tikus DA/Han dengan lebih dari 60% hewan betina mati karena adenokarsinoma endometrium, dan tikus BDII/Han dengan 87 - 90% hewan mati karena adenokarsinoma endometrial. Keterbatasan dari hewan model ini adalah sebagai berikut:

- a. Tidak praktis untuk mendapatkan sejumlah tumor dengan ukuran yang dapat dibandingkan untuk tujuan screening pada waktu yang bersamaan.
- b. Pola metastasis tidak seragam dan sulit untuk menentukan tahap yang akurat.
- c. Biasanya tidak reproduibel dan kebanyakan terdeteksi berasal dari infeksi virus (Lamprecht Tratar et al., (2018).

Transplantable tumors

Model ini berdasarkan menggunakan cell line kanker atau jaringan yang dapat ditumbuhkan pada mencit atau tikus. Terdapat dua metode transplantasi:

- a. Transplantasi Heterotopik

Meliputi transplantasi sel tumor atau jaringan pada situs lain selain situs asalnya. Metode ini meliputi transplantasi secara i.p. atau s.c, dimana tumor berproliferasi dalam bentuk *ascites* atau solid tumor

- b. *Transplantasi Orthotopic*

Transplantasi sel kanker pada lokasi anatomi atau jaringan dimana tumor didapatkan. Misalnya tumor paru-paru di transplantasikan ke paru-paru.

Berdasarkan asal *cell line* kanker atau jaringan-nya, terdapat dua jenis model transplantasi:

- a. *Syngenic models*

Penggunaan sel line atau jaringan kanker tikus atau mencit yang ditransplantasikan pada hewan lain dengan latar belakang genetic yang sama dengan asal sel line atau jaringan.

- b. *Xenograft models*

Tumor yang ditransplantasikan berasal dari manusia. Dapat menyebabkan reaksi penolakan imun yang parah. Untuk tujuan ini digunakan mencit athymic (nude) atau mencit dengan *severe combined immunodeficiency* (scid). Kedua jenis hewan ini mengalami

kekurangan dalam respon imun terhadap material asing yang ditransplantasikan (Navale, A.M. (2012).

Experimentally induced tumors models

Virus induced tumors

Dua tumor diinduksi oleh virus yang paling sering digunakan adalah Friend leukemia dan Rous sarcoma. Friend leukaemia terjadi pada tikus Swiss dewasa. Ditransmisikan ke tikus lain dengan injeksi filtrat bebas sel homogenat leukemia-limfa. Rous sarcoma adalah tumor pada anak ayam, ditransmisi melalui implantasi fragmen tumor atau inokulasi bahan bebas sel dari homogenat tumor. Terdapat interval 2-4 bulan antara inokulasi virus dan munculnya leukemia sehingga model-model ini umumnya tidak digunakan untuk penemuan obat.

Radiation induced tumors

- a. Tumorigenesis kulit pada mencit tidak berambut SKH-1 yang diinduksi sinar UV

Mencit peranakan tidak berambut (SKH-1) diradiasi selama 5 hari/minggu dengan dosis total 74.85 J/cm^2 UVA dan

2.44 J/cm^2 UVB selama 22 minggu. Mencit yang diradiasi mengalami perkembangan rata-rata 16 tumor/mencit pada minggu ke-23 dengan rata-rata jumlah karsinoma per mencit sebesar 2,1. Obat diaplikasikan secara topical dua kali seminggu dengan dosis 8 mg/cm^2 segera setelah radiasi UV. Parameter seperti, insiden tumor kulit (jumlah mencit dengan tumor), multiplikasi tumor (rata-rata jumlah tumor per mencit), reduksi kejadian papilloma kulit, onset munculnya tumor yang pertama dan pemeriksaan histopatologi tumor termasuk dengan Western Blotting atau immunohistochemistry untuk regulasi protein siklus sel dipelajari.

- b. Model tumorigenesis kulit dua tahap

Induksi tumor dicapai dalam dua tahap, inisiasi dan promosi. Inisiasi dilakukan dengan aplikasi tunggal DMBA (9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene, 50 nmol) secara topical diikuti proses promosi dengan dua kali seminggu pemberian sinar UVB (250

mJ/cm²) selama 25 minggu. Penelitian dengan menggunakan model ini menyediakan pembelajaran mengenai proses karsinogenesis. Aksi kerja dari obat juga dapat diteliti, apakah obat tersebut dapat mengobati atau mencegah proses inisiasi atau promosi.

c. Kekurangan

Keterbatasan dari penggunaan radiasi dalam menginduksi tumor adalah sebagai berikut:

Penggunaan radiasi dapat menyebabkan timbulnya bahaya radiasi terhadap peneliti.

Membutuhkan waktu yang lama untuk menginduksi tumor dan parameter evaluasi yang membosankan merupakan kekurangan dari model tipe ini.

Chemically induced tumors

Karsinogen kimia pada umumnya merupakan elektrofil yang bersifat sangat reaktif (memiliki 1 defisiensi atom elektorn) yang bereaksi dengan atom yang kaya dengan electron pada RNA, DNA, dan potein selular (nukleofilik). Penggunaan karsinogen

kimia dalam menginduksi tumor memiliki keterbatasan yakni adanya kemungkinan efek karsinogen terhadap hewan lain dan personnel yang dihasilkan dari karsinogen yang diekskresikan dan metabolitnya pada feses dan urin hewan.

a. DMBA menginduksi tumor payudara

Tikus betina berumur 50 hari diberikan dosis tunggal 12 mg DMBA (9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene). Tumor ganas yang pertama dapat dideteksi 20 - 30 hari kemudian. Berat tumor dapat ditentukan dengan palpasi, membandingkan volume setiap tumor terhadap model plastisin. Berat tumor dihitung dengan cara perkalian berat model dengan faktor pengali dimana berat spesifik plastisin dan tumor berhubungan. Obat diadmitsitrasikan secara subkutan dimulas setelah massa tumor telah mencapai 1 gram. Perubahan volume tumor direkan. Pemeriksaan histopatologi dari tumor yang meliputi indeks mitotic dapat menunjukkan bagaimana mekanisme aksi obat.

b. MNU menginduksi tumor payudara

Tikus berumur 50 hari yang diinduksi kanker dengan MNU merupakan model yang populer karena prosedur ini pada umumnya menghasilkan 100% insiden adenokarsinoma dalam waktu 120–150 hari pemberian karsinogen. Tikus betina Sprague-Dawley

berumur 50 hari diberikan injeksi IV tunggal 50 mg MNU/kg-bb (pH 5.0). Agen kemopreventif diberikan biasanya 1 minggu sebelum pemberian karsinogen dan berlanjut sampai hewan uji dibunuh. Multiplikasi tumor pada umumnya sekitar 4 -6 per hewan dan latensinya pada umumnya 65 – 80 hari. Agen yang menunjukkan hasil positif pada model ini biasanya diujikan pada hewan yang lebih tua di mana karsinogen diadministrasikan pada hewan berumur 100 – 120 hari.

c. *DEN Lung cancer models*

Model diethylnitrosamine (DEN) menginduksi adenokarsinoma paru diikuti dengan injeksi subkutan dua kali seminggu sebesar 17.8 mg DEN/kg-bb dimulai pada umur 7–8 minggu dan berlanjut selama 20 minggu. Agen kemopreventif biasanya diadministrasikan dalam makanan sejak 1 minggu sebelum pemberian pertama karsinogen dan berlanjut selama 180 hari.

d. *Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) Lung cancer models*

Mencit betina (strain A/J) umur 6 minggu diberikan dosis tunggal 10µm NNK dalam saline dengan injeksi i.p. Pada umumnya 6–8 adenoma per hewan terbentuk dalam 16-minggu pengujian dengan 100% insiden. Pada minggu ke- 52, insiden

adenokarsinoma adalah sekitar 70–80% dengan multiplikasi 15–17 tumor (kebanyakan berupa adenoma alveolus padar dengan sedikit adenokarsinoma) per hewan.

e. *DMAB (3, 2-dimethyl-4-aminobiphenyl) menginduksi tumor*

Tumor diinduksi pada tikus betina F344 dengan injeksi subkutan DMAB 50mg/kg sekali seminggu selama 20 minggu. Hal ini dapat menginduksi multiple tumor colon pada sekitar 26-30% hewan yang diberi makan low fat diet, dan 74% hewan yang diberi makan high fat diet. Model ini memproduksi adenomas (tumor jinak) dan adenokarsinoma (tumor ganas) pada usus besar. Berbagai parameter seperti insiden tumor, ukuran tumor dan histopatologi jaringan tumor dapat dipelajari. Limitasi dari model ini adalah memerlukan multiple injeksi dari DMAB untuk menginduksi tumor kolon. Terlebih lagi, terdapat induksi neoplasma pada situs lain selain kolon seperti adenokarsinoma pada kelenjar mammae pada tikus betina, sarcoma pada kelenjar liur, squamous cell carcinoma pada lubang telinga dan kulit, gastric papillomas, sarkoma dan limfoma, karsinoma pada kandung kemih. Hal tersebut memperumit perbandingan terhadap respon obat.

f. *AOM and DSS Modelling Colitis Induced Cancer*

Penggunaan *azoxymethane* (AOM)/ *Dextran Sodium Sulfate* (DSS) sebagai model kanker kolon merupakan model yang kuat, reproduibel, dan relative tidak mahal sebagai model inisiasi dan promosi. Model ini menginduksi kerusakan DMA yang diikuti dengan siklus berulang colitis. AOM merupakan prokarsinogen, mengalami metabolisme oleh CYP450, isoform CYP2E1, menjadi methylazocymethanol (MAM), suatu spesies alkilasi yang dapat menginduksi terbentuknya DNA *adduct O6-methylguanine* sehingga menghasilkan transisi G→A. DSS merupakan polisakarida menyerupai heparin yang terlarut dalam air minum dan dapat menyebabkan kerusakan pada epitel kolon, menginduksi colitis yang mirip seperti fitur pada IBD (Parang, B. et al., (2016).

Genetically Engineered Mouse Models (GEMs)

a. Mencit Transgenik

- Mencit transgenik adalah mencit yang dimodifikasi dimana gen dari luar dimasukkan dan digabungkan dengan stabil ke genom dari tiap sel mencit dan gen ini dapat ditransmisikan ke keturunannya.

A. Pada mencit transgenik, DNA transgenik terdapat pada salah satu

kromosom tetapi tidak pada kromosom homolognya.

B. *p53^{+/-} Wnt-1 transgenic mice*: mencit *p53^{+/-}* disilangkan dengan mencit *transgenic* MMTV-*Wnt-1* untuk mendapatkan model tumorigenesis kelenjar mammae dimana MMTV merupakan promotor tumor virus kelenjar mammae mencit

C. *TRAMP transgenic Mice*: Mencit ini memiliki promotor probasin promoter yang mengatur ekspresi antigen tumor SV40. Mencit ini mengalami kanker prostat pada umur 12 minggu dan mengalami metastasis dalam 3 minggu. Mencit TRAMP merekapitulasi berbagai aspek kanker prostat manusia.

D. *Apc deficient mice*: Mencit ini secara spontan mengalami preneoplastik intestinal polip karena adanya mutase dominan pada gen *Apc* (adenomatous polyposis coli). Mutasi gen ini umum terjadi pada sebagian besar kanker kolon manusia.

b. Knockout Mice

1. Berbeda dengan mencit transgenik yang diproduksi dengan

menambahkan DNA eksogen secara random, mencit knockout diperoleh dengan insersi atau delesi gen dengan targeting sehingga menghasilkan rekombinasi homolog dan memiliki tingkat kesuksesan produksi yang sangat rendah.

2. *The Nkx 3.1 knockout mice:* Nkx 3.1 merupakan tumor suppressor gene spesifik untuk prostat. Gen ini penting untuk diferensiasi dan fungsi prostat. Kehilangan fungsi dari gen ini menghasilkan gangguan histopatologi yang menggambarkan gangguan pada kanker prostat manusia.

3. *Homozygous p53 knockout mice:* Mencit ini sangat rentan terhadap tumorigenesis terutama limfoma.

4. *Brcal conditional knockout model:* Delesi Brcal diinduksi menggunakan sistem Cre loxp dengan mengekspresikan Cre dibawah kontrol MMTV-LTR or WAP. Hewan akan mengalami tumor kelenjar mammae pada umur 10 - 13 bulan (Gaj, et al., (2013), Platt, R. J, et al., (2014)

tumor models ,Experimentally induced tumors models (Virus induced ,Radiation induced Chemically induced), dan Genetically Engineered Models.

DAFTAR PUSTAKA

Derelanko, M. 7 Auletta, C. 2014. Handbook of Toxicology (3rd Ed). Boca Raton: CRC Press

Chavan, A., & Universiy, P. (2014). Animal Models of Cancer : a Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015(January 2013), 558–567.

Day, C., Merlino, G., Dyke, T. Van, & Cancer, N. (2016). Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. Cell, 163(1), 39–53.

Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, 31(7), 397–405.

Kemp, C. J. (2015). Animal models of chemical carcinogenesis: Driving breakthroughs in cancer research for 100 years. Cold Spring Harbor Protocols, 2015(10), 865–875.

Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in

KESIMPULAN

Didapatkan terdapat hewan model untuk pengujian anti kanker yaitu *Spontaneous tumor models, Transplantable*

Cancer Research. *Frontiers in Oncology*, 8(July), 1–18.

Navale, A.M. 2012. Animal Models of Cancer: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4(1): 19-28

Parang, B., Barret, C.W., & Williams, C.S. 2016. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol*. 1422: 297-307.

Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., ... Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159(2), 440–455.

Ruggeri, B. A., Camp, F., & Miknyoczki, S. (2014). Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, 87(1), 150–161.