

EKSPRESI GEN APC DAN MSH2 PADA KANKER
KOLOREKTAL, KAJIAN SEBAGAI PARAMETER
FAKTOR HEREDITER

APC and MSH2 Gene Expression as a
Predictor of Hereditary Colorectal Cancer
Predisposition



TJAHJADI ROBERT TEDJASAPUTRA

(CO13171017)

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDIN MAKASAR

2020

DISERTASI

**EKSPRESI GEN APC DAN MSH2 PADA KANKER KALOREKTAL : KAJIAN
SEBAGAI PARAMETER FAKTOR HEREDITER**

**APC and MSH2 Gene Expression as a Predictor of Hereditary
Colorectal Cancer Predisposition**



TJAHJADI ROBERT TEDJASAPUTRA

(CO13171017)

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN**

UNIVERSITAS HASANUDIN MAKASAR

2020

Daftar Tim Pembimbing Dan Penguji :

Promotor : Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)

Ko-promotor : Prof.dr.Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok.

Prof.dr.Muh.Nasrum Massi,Ph.D,Sp.MK

Anggota : Prof.dr.Marcellus Simadibrata, Ph.D, SpPD-KGEH

Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes

Dr. dr. Prhantono, SpB.B(K)Onk

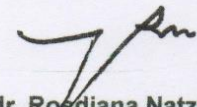


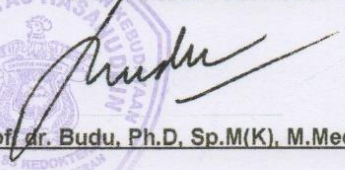
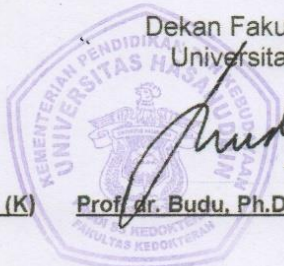
Dr. dr. Muh. Lutfi Parewangi, SpPD-KGEH

Dr. dr. Ibrahim Labeda, SpB-KBD

Dr. dr. Rina Masada, SpPA(K),M.Phil-DFM

DISERTASI**EKSPRESI GEN APC DAN MSH2 PADA KANKER KALOREKTAL : KAJIAN
SEBAGAI PARAMETER FAKTOR HEREDITER**

Disusun dan diajukan oleh

Tjahjadi Robert Tedjasaputra
C013171017telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 4 Desember 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syaratMenyetujui
Komisi Penasehat,
Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Promotor
Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok
Ko-Promotor
Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK
Ko-PromotorKetua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin
dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)
Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

SURAT PERNYATAAN NON PLAGIAT

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Tjahjadi Robert Tedjasaputra
No Pokok : C013171017
Program Pendidikan : Doktor (S3)
Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan secara benar, jujur dan bertanggung jawab bahwa disertasi yang berjudul "Ekspresi Gen APC Dan MSH2 pada Kanker Kolorektal : Kajian Sebagai Parameter Faktor Hereditier." adalah **asli dan bukan plagiat/bebas dari plagiat.**

Jika dikemudian hari ternyata disertasi ini sebagian/seluruhnya mengandung unsur plagiat maka disertasi dibatalkan dan bersedia menerima sanksi secara hukum dari Fakultas maupun Universitas.

Demikian Surat Pernyataan ini dibuat tanpa tekanan siapapun.

Makassar, 16 Nopember 2020

Mahasiswa,



Tjahjadi Robert Tedjasaputra

PRAKATA

Segala puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Pengasih, karena berkat anugerah dan kasih karuniaNya penulis dapat menyelesaikan karya akhir disertai ini.

Kanker kolorektal (KKR) sampai saat ini masih merupakan kelompok kasus kanker terbanyak di dunia maupun di Indonesia. Prevalensi usia rata-rata insidensi KKR juga mempunyai kecenderungan menurun lebih muda. Kanker kolorektal dibagi menjadi KKR sporadik dan KKR herediter. KKR herediter adalah keluarga dengan kecenderungan menderita KKR. KKR herediter mempunyai warisan gen yang bermutasi dari salah satu pihak orang tua yang merupakan autosomal dominan dan menyebabkan KKR pada usia muda. Terdapat 2 jenis KKR yaitu FAP (*Familial Adenoma Polyposis*) dan HNPCC (*Hereditary Non-polyposis Colon Cancer*) atau *Lynch syndrome* beserta variannya. Usia KKR ini rata-rata kurang dari 45 tahun. Untuk mendiagnosis KKR herediter selama ini menggunakan kriteria Amsterdam dan Bethesda dengan cara anamnesis. Pemeriksaan herediter gen dengan sekuensi DNA yang selama ini dilakukan belum dapat digunakan sebagai kriteria herediter karena bervariasi jenis gen serta "hot spot". APC dan MSH2 adalah gen dengan prevalensi yang terbanyak dari berbagai gen KKR herediter lain. Untuk hal itu perlu dilakukan penelitian secara klinis yang digabungkan dengan biomolekular sebagai parameter untuk mendiagnosis KKR herediter.

Manfaat diketahuinya faktor herediter pada KKR dapat digunakan untuk terapi yang lebih tepat terhadap KKR serta pencegahan lebih dini pada

keluarga pasien yang mempunyai risiko KKR berulang dengan mengubah faktor risiko KKR yang dapat dimodifikasi.

Berbagai pengetahuan, pengalaman serta kendala yang dialami penulis sampai akhir penulisan ini. Berkat pertolongan bantuan para promotor, pembimbing dan penguji, puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa disertai ini dapat kami selesaikan.

Perkenankan pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin. Prof.Dr.Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA. Dekan FK UNHAS: Prof.dr.Budu,Ph.D,SpM (K),M.MedEd. D. Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, dr. Agussalim Bukhari, M.Med, PhD, SpGK(K). yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doctor Ilmu Kedokteran di Universitas Hasanuddin, Makassar.

Terima kasih kami yang sebesar-besarnya juga kami haturkan kepada Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, Sp.MK(K) sebagai promotor, yang selalu membimbing dan mendorong penulis dengan penuh kesabaran dan pengertian sejak awal hingga selesai pendidikan.

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Bioki, sebagai ko-promotor memberikan bimbingan dan semangat serta masukan dalam menyelesaikan pendidik ini.

Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, SpMK, sebagai ko-promotor dalam kesibukan yang padat membimbing dan mendorong penulis dalam menyelesaikan pendidik ini.

Prof.dr.Marcellus Simadibrata, Ph.D, SpPD-KGEH, sebagai penguji eksternal yang selalu memberikan pandangan dan masukan dalam penulisan desertasi ini.

Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes, sebagai pembimbing metode penelitian dan penguji dengan sabar dan penuh kesungguhan memberikan nasihat dan masukan yang sangat berarti dalam penelitian.

Dr. dr. Prhantono, SpB.B(K)Onk, yang selalu memberikan kesempatan penulis memberikan masukan dan pandangan yang sangat bermanfaat dalam penulisan disertasi.

Dr. dr. Muh. Lutfi Parewangi, SpPD-KGEH, sebagai penguji dan sejawat dalam keilmuan gastroenterologi yang banyak memberikan masukan dan saran dalam melakukan penulisan disertasi.

Dr. dr. Ibrahim Labeda, SpB-KBD, sebagai penguji yang memberikan pandangan dan masukan yang bermanfaat dalam menyelesaikan penulisan disertasi.

Dr. dr. Rina Masada, SpPA(K),M.Phil-DFM, sebagai penguji memberikan masukan dan nasihan yang berguna dalam penulisan disertasi.

Prof.Dr.F.X. Budhianto Suhadi, MM, SpPK yang memberikan dorongan dan semangat kepada penulis untuk mengikuti program doktor sejak awal.

dr. Farsida dr. Rahmini, dr. Alfiah Amiruddin, dr.Feny dan dr. Heidy, sebagai sejawat dalam kelompok kami yang bekerja sama melakukan pendidikan program doktor.

Prof. DR. dr. Daldyono SpPD, KGEH, Prof. dr. Azis Rani SpPD, KGEH, Prof. DR. dr. Dadang Makmun SpPD, KGEH. Prof. DR. dr. Ari Fahrial Syam SpPD, KGEH Prof.DR.dr. Murdani Abdullah SpPD, KGEH dr. Dharmika SpPD, KGEH, Prof. DR.dr. Aru Sudoyo SpPD,KHOM atas dorongan dan dukungan dalam menyelesaikan pendidikan S3.

Staf S3 Pak.Akmal, S Sos, MA. Pak Abdul Muin La Tanribali, Pak Rahmad serta Ibu. Farida,SE, yang sejak awal pendidikan membantu dalam menyelesaikan administrasi dalam Pendidikan doktor.

Staf Laboratorium Biomolekular FK UNHAS: Pak. Romi Usman, Marwani dan Pak. Mus Jabar yang banyak kontribusi dalam melakukan penelitian ini. Staf Endoskopi RSUD

Tarakan dr. Shirly Elisa, Ibu Retno, Ibu. Erni serta staf Endoskopi Siloam Hospital Karawaci Ibu. Novi, Ibu. Alvi, Ibu. Rita dan dalam membantu melakukan penelitian ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada istri saya dr. Lucia Setiawati Sutedja SpM, FIACLE yang mendampingi saya menyelesaikan disertasi ini. Kepada anak-anak, cucu dan menantu dr. Shirly Elisa, Listy dan Chelsea, dr. Arif K, yang telah memberikan kesempatan serta semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.

Penulis menyadari terdapat keterbatasan dan kekurangan dalam melakukan penelitian serta penyusunan disertasi ini, oleh karena itu dengan kerendahan hati penulis menyampaikan maaf yang sebesar-besarnya. Kiranya hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi kepentingan pelayanan klinis dan ilmu pengetahuan. Semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan memberikan berkat dan rahmatNya bagi semua pihak yang telah membantu hingga selesainya penulisan disertasi ini.

Makassar 5 Desember 2020

Tjahjadi Robert Tedjasaputra

ABSTRAK

TJAHJADI ROBERT TEDJASAPUTRA. *Ekspresi mRNA Gen APC dan MSH2 pada Kanker Kolorektal, Kajian sebagai Parameter Faktor Herediter* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Rosdiana Natzir, Nasrum Massi).

Penelitian ini bertujuan menentukan risiko KKR herediter pada keluarga (Proband) yang dilakukan melalui riwayat pedigri dengan prinsip mendel dan deteksi langsung mutasi molekuler gen herediter. Analisis Bayesian dengan menilai risiko awal (*Prior risk*) dan dimodifikasi informasi kondisi lain (*conditional information*) dapat digunakan untuk menilai risiko probabilitas status herediter pada keluarga pasien KKR secara keseluruhan.

Metode penelitian yang digunakan adalah translasional deskriptif dan analitik studi potong lintang dengan teknik *nonprobability consecutives*. Penelitian ini dilakukan tiga sekuensial studi yaitu: 1. ekspresi mRNA gen APC dan gen MSH2 kuantitatif pada jaringan dan darah pasien kanker kolorektal; 2. ekspresi gen APC dan MSH2 mRNA kuantitatif pada subjek control; 3. analisis hubungan faktor risiko dengan herediter; 4. analisis pedigri dan Bayesian pada keluarga pasien (Proband).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada nilai APG ($p:0,014$). Namun, tidak bermakna pada MSH ($p:0,46$) antara KKR dan subjek kontrol. Hubungan resiko yang bermakna dengan herediter adalah faktor usia, riwayat keluarga dan stadium (*staging*) KKR. Selanjutnya, telah dilakukan penelitian ekspresi gen mRNA APC dan MSH2 pada subjek KKR dan control serta ditentukan titik potong ekspresi dalam menilai hereter kanker kolorektal. Hubungan resiko yang bermakna dengan herediter adalah faktor riwayat keluarga, usia dan stadium KKR. Analisis probabilitas karier KKR pada keluarga KKR (Proband) dilakukan menggunakan pedigri prinsip model dan analisis Bayesin.

Kata kunci: KKR herediter, Gen APC, Gen MSH2, Analisis Bayesian



ABSTRACT

TJAHJADI ROBERT TEDJASAPUTRA. *Risk Assessment in Hereditary Colorectal Cancer Family by Using APC and MSH2 mRNA Gene Expressions and Bayesian Analysis*

The purpose of this study is to determine the risk of hereditary TRC in the family (Proband) which was carried out through a pedigree history with Mendelian principles and direct detection of hereditary gene molecular mutations. Bayesian analysis by assessing the prior risk and modified conditional information can be used to assess the risk of the probability of hereditary status in the KKR patient's family as a whole.

Descriptive translational and cross-sectional analytic studies used non-probability consecutive sampling technique. Three sequential studies were conducted. 1. Quantitative expression of the APC gene mRNA and MSH2 gene in the tissues and blood of colorectal cancer patients. 2. Quantitative expression of APC and MSH2 MRNA genes in controlled subjects. 3. Analysis of the relationship between risk factors and heredity 4. Pedigree and Bayesian analysis in the patient's family (Proband).

There is a significant difference in the APC value ($p: 0.014$) but it is not significant for MSH2 ($p: 0.46$) between KKR and controlled subjects. The significant relationship between risk and heredity is age, family history and KKR stage (staging). A study of APC and MSH2 mRNA gene expressions in KKR and controlled subjects and the cutoff point of expression is determined in assessing colorectal cancer heretics. The significant risk association with heredity is family history, age and TRC stage. The KKR career probability analysis in the KKR family (proband) is carried out using the Medel principle pedigree and Bayesian analysis.

Keywords: hereditary TRC, APC gene, MSH2 gene, Bayesian analysis



DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR

HALAMAN PENGESAHAN.....ii

DAFTAR TIM PENGUJI.....iii

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....iv

PRAKATA.....v

ABSTRAK..... ix

DAFTAR ISI..... xiii

DAFTAR TABEL..... xvi

DAFTAR GAMBAR..... xvii

DAFTAR SINGKATAN..... xix

BAB 1 PENDAHULUAN 1

1.1. Latar Belakang Masalah 1

1.2. Rumusan Masalah 4

1.3. Pertanyaan Penelitian 5

1.4. Hipotesis Penelitian 5

1.5. Tujuan Penelitian 6

1.6. Manfaat Penelitian.....6

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 7

2.1. Kelainan Gen terjadinya Kanker	7
2.1.1. Tahapan perubahan sel	7
2.1.2. Kemampuan mandiri mencukupi sinyal pertumbuhan	8
2.1.3. Tumor sebagai jaringan yang kompleks	10
2.2. Dasar Molekular Kanker Kolon	10
2.2.1. Instabilitas genomik kanker kolorektal	12
2.2.2. Inaktivasi mutasi gen supresor tumor	15
2.2.3. Jalur aktifitas onkogen	17
2.2.4. Sekuensing genom kanker kolorektal	17
2.2.5. Perubahan genomik dan progresifitas tumor	18
2.2.6. Jalur factor pertumbuhan (<i>Growth factor</i>)	20
2.2.7. Jalur stem sel	21
2.3. Jenis Kanker Kolorektal Berbasis Genetik dan Molekular	21
2.3.1. Kanker kolorektal sporadik	23
2.3.2. Sindrom kanker kolorektal herediter	27
2.3.2.1. <i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> (HNPCC)	27
2.3.2.2. <i>Familial adenomatous polyposis</i> (FAP)	33
2.3.2.3. Varian sindroma polyposis familial	39
2.4. Kompleksitas Mutasi Genetic pada Kanker Kolorektal	41
2.4.1. Kompleksitas gen APC	41
2.4.2. Kompleksitas gen HNPCC	41
2.4.3. Menentukan KKR sporadik dan KKR MSI-H non-familial	42
2.4.4. Profil molekul dan demografi KKR familial dan non-familial	45
2.5. Petanda Prediksi Kanker Kolorektal	48
2.5.1. Deteksi molekul noninvasive	49

2.5.2. Pengaruh genetik pada populasi yang rentan mengalami KKR	49
2.5.3. Tes genetik menentukan predisposisi KKR	49
2.5.4. Riwayat dan silsilah keluarga menentukan risiko herediter.....	54

BAB 3 KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI

OPERASIONAL.....	57
3.1 Kerangka Teori	57
3.2 Kerangka Konsep	58
3.3 Definisi Operasional.....	61

BAB 4 METODE PENELITIAN..... 63

4.1. Desain Penelitian	63
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	63
4.3. Populasi Penelitian	63
4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	63
4.5. Estimasi Besar Sampel	64
4.6. Etik dan <i>Informed Consent</i>	65
4.7. Cara Kerja	65
4.8. Alur Penelitian	67
4.9. Pengolahan dan Analisa Data	67

BAB 5 HASIL PENELITIAN

A. Karakter pasien dan kelompok kontrol dan Penentuan Titik Potong APC dan MSH	68
B. Deskripsi APC dan MSH (Darah dan Jaringan) pada subjek KKR, prevalensi mutasi dan prevalensi herediter pada KKR.....	69
C. Analisis hubungan antara herediter dengan Usia, Jenis Kelamin, Letak KKR, Staging, Riwayat Keluarga, Diferensiasi Histopatologi.....	71

D. Analisis Multivariat, Skoring faktor dan Kurva ROC.....	74
E. Analisa Pedigri Kanker kolorektal (KKR) Herediter	79
F. Analisa Bayesian Proband.....	82
BAB 6 PEMBAHASAN.....	.83
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.95
DAFTAR PUSTAKA.....	.97

Daftar Tabel

Tabel i. Mutasi APC pada neoplasma KKR.....	35
Tabel ii. Pola Instabilitas Genomik pada KKR.....	52
Tabel iii. Gen supresor tumor dan onkogen yang umum berhubungan dengan KKR.	53
Tabel iv. Prognostik dan prediktif marker DNA pada kanker kolorektal.....	54
Tabel 1. Karakteristik Dasar subjek KKR dan subjek kontrol.....	68
Tabel 2. Ekspresi APC dan MSH pada Kelompok Kontrol.....	68
Tabel 3. Penentuan Titik Potong nilai ekspresi mRNA APC dan MSH.....	69
Tabel 4 a dan 4 b. Deskripsi APC dan MSH (Darah dan Jaringan) subjek KKR.....	69
Tabel 5. Prevalensi Mutasi pada Pasien Kanker Kolorektal.....	70
Tabel 6. Prevalensi Herediter pada kelompok Kanker Kolorektal.....	70
Tabel 7. Hubungan Faktor Risiko dengan Herediter Berdasarkan APC	71
Tabel 8. Hubungan Faktor Risiko dengan Herediter Berdasarkan MSH2.....	72
Tabel 9. Hubungan Faktor Risiko dengan Herediter Berdasarkan APC dan MSH2.	73

Tabel 10. Analisis Multivariat Faktor Risiko KKR (Hereditas berdasarkan APC)	74
Tabel 11. Analisis Multivariat Faktor Risiko KKR (Hereditas Berdasarkan MSH2)...	75
Tabel 12. Analisis Multivariat Faktor Risiko KKR (Hereditas Berdasarkan APC dan MSH2).	76
Tabel 13. Perhitungan Probabilitas pada Semua Skenario Subjek Step 1.....	78
Tabel 14. Prevalensi differensiasi histopatologi pada subjek KKR.....	79
Tabel 15. Analisa Bayesian Proband.....	82

Daftar Gambar

Gambar 1: Kemampuan sel kanker yang didapat.....	7
Gambar 2. Sirkuit terintegrasi dari sel.	9
Gambar 3. Jaringan kompleks tumor	10
Gambar 4. Multifaktor Karsinogenesis Kolorektal.....	11
Gambar 5. Perubahan genetik dan epigenetik DNA berakibat karsinogenesis.....	12
Gambar 6. Jalur Gen MMR pada sel manusia.....	14
Gambar 7. Gen dan jalur faktor pertumbuhan (Growth Factor Pathway) yang mengerakan progresifitas KKR.....	19
Gambar 8. Jalur Instabilitas Genetik yang mengarah ke Neoplasma Kolon.....	20
Gambar 9. Perubahan genetik berhubungan dengan Tumorigenesis kolorektal.....	22

Gambar 10. Histopatologi <i>Adenoma Carcinoma sequence</i> Kanker Kolorektal.....	22
Gambar 11. Diagram bagan jalur karsinogenesis kolon.....	27
Gambar 12: Adenoma jinak kolorektal FAP dan HNPCC	29
Gambar 13. Bagan yang melibatkan proses pembentukan adenoma dan progresi KKR sporadik, HNPCC dan FAP	29
Gambar 14. Wewenang fungsi protein APC yang berhubungan dengan fenotip AAPC (<i>attenuated adenomatous polyposis coli</i>), CHRPE (<i>congenital hypertrophy of retinal pigmented epithelium</i>)	34
Gambar 15. Fungsional dan Properti patogenik dari APC.....	35
Gambar 16. Potongan operasi Colon dengan Poliposis.....	37
Gambar 17. Limfosit infiltrasi tumor pada KKR HNPCC.....	46
Gambar 18. Reaksi mirip Crohn (nodule limfosit B dengan dikelilingi limfosit T)	46
Gambar 19. KKR Sporadik MSI-H berdiferensiasi buruk	47
Gambar 20. Adenokarsinoma musinosa berdiferensiasi sedang sampai buruk.	47
Gambar 21: Sisa arsitektur serrated pada KKR sporadik MSI-H.....	48
Gambar 22. Adenoma serrated berlanjut dengan KKR sporadik MSI-H.....	48
Gambar 23. Kurva ROC Nilai Probabilitas Herediter Berdasarkan APC.....	74
Gambar 24. Kurva ROC Nilai Probabilitas Herediter Berdasarkan MSH2.....	76
Gambar 25. Kurva ROC Nilai Probabilitas Herediter Berdasarkan APC dan MSH.....	77
Gambar 26. Kurva ROC Nilai Probabilitas Herediter Berdasarkan APC dan MSH Step 1...	78
Gambar 27. Analisa Pedigri pada pasien KKR	79

Singkatan

APC	: Adenoma Polyposis Coli
ASCO	: American Society of Clinical Oncology
BAX	: BCL2 Associated X protein
BRAF	: Serine Threonine Protein Kinase Braf
BRCA	: Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
CIN	: Chromosomal Instability
CpG	: Cytosine methylation of DNA (-C-phosphate-G-)
CIMP	: CpG Island Methylation Phenotype
CTNNB1	: Catenin Cadherin-association Protein (Medullo blastoma)
CHRPE	: Congenital Hypertrophy Retinal Pigmented epithelioma
DCC	: Delated In Colon Cancer
EPHA3	: Ephrine Receptor
EGFR	: Epidernal Growth Factor Receptor
GWAS	: Genome Wide Association Study
HNPCC	: Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer
IRS2	: Insulin Receptor Substrate 2
K-ras	: Kirsten RAS
KKR	: Kanker Kolorektal
LOH	: Loss of Heterozygosity
MAP	: Mutyh Associated Polyposis
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
MMR	: Mismatch Repair
MSI	: Microsatellite Instability
MSS	: Microsatelitte Stable
MSH	: Mut S homolog
MLH	: Mut L homolog
MCC	: Mutated in Colon Carcinoma
MUYTH	: MutY to GAA
MUT	: Methyl malonyl CoA mutase (Homosapien)
MYH gene	: MutY Human Homolog gene
PTEN	: Phosphatase and tension homologue gene
PI3KCA	: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PGDH	: Prostaglandin Dehydrogenase
PMS2	: Post Meiotic Segregation increased 2
RAS	: Rat Sarcoma

RER : Replication Error
SMAD : Mothers Against Decapentaplegic Homolog
SSCP : Single Strand Confirmation Polymorphism
TGF β : Transforming Growth Factor β
TP53 : Tumor protein 53
UICC : Union of International Colon Cancer
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt- β
Catenin : Wingless Signal Transducer

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Dasar kanker kolorektal (KKR) adalah mutasi gen spesifik yang secara klinis dibagi menjadi KKR sporadik, KKR familial, dan KKR herediter. Secara statistik, angka kejadian KKR adalah sebagai berikut: KKR herediter 4-6%, KKR familial 30-40%, dan KKR sporadik 50-60%.

Kanker kolon familial (KKR familial) adalah KKR dengan riwayat anggota keluarga menderita KKR. Secara statistik 30% KKR mempunyai riwayat anggota keluarga yang menderita KKR. KKR ini tidak selalu terjadi pada usia muda serta tidak selalu terdapat pada satu pihak dari keluarga. Kelompok ini dikatakan sebagai keluarga dengan kecenderungan KKR dibandingkan keluarga pada umumnya. Juga terdapat bukti bahwa adanya risiko mutasi gen ini tidak otomatis menyebabkan KKR. KKR sporadik yaitu KKR yang tidak terdapat risiko herediter pada keluarga pasien untuk menderita kanker yang sama, namun tetap dapat menderita KKR sporadik. Usia KKR sporadik umumnya lebih dari 60 tahun. KKR herediter adalah KKR yang dihubungkan dengan kelainan genetik spesifik dan terdapat riwayat KKR yang kuat pada satu sisi keluarga. Mereka mempunyai warisan gen yang bermutasi dari satu pihak orang tuanya dan menyebabkan KKR pada usia muda. Terdapat dua jenis utama KKR herediter yaitu HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer, Lynch Syndrome*) dan FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*) beserta variannya. Usia rata-rata KKR jenis ini kurang dari 45 tahun. Riwayat herediter merupakan salah satu risiko KKR yang tidak dapat dimodifikasi selain usia, IBD, dan DM (American Cancer Society 2020, Burt R 1995).

Peran inaktivasi germinal gen APC telah diketahui pada sindrom FAP, tetapi mutasi somatik gen APC juga sangat sering pada KKR sporadik akibat hipermetilasi promotor. Diketahui >700 mutasi somatik pada gen ini, yang kebanyakan (95%) adalah *nonsense* atau mutasi *frame-shift* yang memproduksi protein tidak lengkap dan fungsi yang tidak normal. Mutasi gen pada KKR sporadik menunjukkan spektrum yang luas dari perubahan APC.

Korelasi genotipe dan fenotipe pada FAP tidak pasti, karena mutasi APC dapat bermanifestasi intra atau ekstra kolon pada keluarga yang berlainan, bahkan pada keluarga yang sama termasuk kembar identik. Pengaruh genetik dan lingkungan epigenetik berperan terhadap variasi fenotipenya. Mutasi APC dapat terjadi melalui garis germinal yang secara autosomal dominan pada FAP atau secara somatik pada sporadik. Perbedaannya adalah pada FAP terjadi satu tahap lebih dulu pada mutasi germinal, sedangkan pada sekelompok KKR sporadik pada kenyataannya adalah akibat *low penetrance polymorphisme* APC seperti I1307K dan E1317Q. 20% KKR pada FAP mempunyai riwayat keluarga yang negatif dan menunjukkan mutasi baru pada lokus APC (*Adenomatous Polyposis Colli*). 90% kasus FAP baru terdiagnosis pada usia 50 tahun. Pada FAP, interval waktu antara terbentuknya adenoma dan diagnosis kanker serta kematian sangat cepat yaitu tiga tahun (Byers T 1997, Sudoyo AW 2005, Burt R, 1995).

Seberapa banyak penyakit familial yang tersembunyi belum diketahui. FAP merupakan model yang sudah ditetapkan sebagai jalur melalui perubahan APC, diikuti mutasi K-ras serta tumor supresor gen DCC, TP53 dan lain-lain. *Loss of Heterogenicity* (LOH) akibat inaktivasi kopi kedua heterogenositas berhubungan dengan kromosom aneuploid dan juga kanker diploid pada mikrosatelit DNA stabil. Instabilitas kromosom dianggap sebagai syarat jalur supresor yang diawali mutasi APC. Jalur alternatif lain dipikirkan sebagai pertimbangan yang lebih kecil (Byers T 1997).

HNPCC terjadi akibat mutasi germinal pada MMR DNA MSH2 dan MLH1. Dua gen yang paling sering dipengaruhi, termasuk *biomarker* defisiensi perbaikan DNA akibat mutasi *frameshift* pada *replication error* (RERs). Lebih dikenal dengan *marker* mikrosatelit (MSI) atau “mutator” fenotipe. Secara klasik untuk mendiagnosis HNPCC adalah melalui Kriteria Amsterdam atau Kriteria Behtesda. KKR herediter HNPCC diketahui menunjukkan predileksi di kolon proksimal, tetapi 40% menunjukkan di kolon kiri dan rektum. Kanker rektum merupakan komplikasi yang penting pada anastomosis ileorektal setelah total kolektomi. HNPCC lebih banyak terjadi pada pria, sedangkan KKR sporadik MSI-H (*Microsatelite Instable-High*) lebih banyak pada wanita dan perokok. Pada wanita lebih menunjukkan metilasi MLH1 (Mut L Homolog) sebagai genesis KKR MSI-H sporadik. HNPCC cenderung terjadi pada usia lebih muda dan KKR sporadik MSI-H lebih berhubungan dengan usia yang lebih tua dari pada KKR MSS (*Microsatelite Stable*) atau MSI-L (*Microsatelite Instable-Low*). 90% KKR sporadik MSI-H juga terletak di kolon proksimal (Byers T 1997).

Keluarga yang memenuhi syarat pada Kriteria Amsterdam tetapi kekurangan MSI-H akan bermanifestasi sebagai KKR pada usia tua, kurang keragaman kanker, tidak mempunyai kecenderungan tumor pada kolon proksimal, lebih banyak adenoma yang secara histologi kurang mirip dengan MSI-H (kurang diferensiasi musinosa dan infiltrasi limfosit). HNPCC menempati 5% dari KKR. Studi populasi juga tampak adanya kasus tunggal, usia tua, dan tumor yang tidak terletak di proksimal kolon

sebagai HNPCC, semua hal yang tidak sesuai dengan *Sindroma Lynch* (Byers T 1997).

Kebanyakan KKR MSI-H adalah sporadik yang disebabkan metilasi dan peredaman gen hMLH1, tetapi hal ini tidak spesifik dapat terjadi juga pada sebagian HNPCC dan KKR non-MSI-H. Sebaliknya mutasi dengan hilangnya ekspresi hMSH2, hMSH6 atau hPMS2 dapat terjadi pada KKR sporadik maupun herediter, maka diperlukan penelitian untuk membedakan hal ini dengan HNPCC (Kinzler KW, Vogelstein B 1996).

Saat ini KKR sporadik MSI-H dan HNPCC dibedakan berdasarkan gambaran demografi, histogenesis, dan morfologi mikroskopis. KKR sporadik MSI-H dapat terkecoh dengan HNPCC karena kebanyakan KKR adalah MSI-H dan KKR sporadik kurang menampilkan gambaran klinis yang tradisional. Di samping itu, mutasi gen MMR (*Missed Match Repair*) pada HNPCC yang kurang penetrasi dapat terjadi pada usia tua dan kasus tunggal. Bahkan di Negara Jepang profil patologi molekular KKR MSI-H sporadik lebih sesuai dengan HNPCC.

Telah diduga bahwa polip hiperplasia yang besar di kolon proksimal adalah prekursor KKR sporadik MSI-H. Beberapa kasus HNPCC dengan MSI-H menunjukkan juga kerusakan pada sinyal Wnt sebagai indikasi mutasi APC, *beta-catenin*, sedangkan pada KKR sporadik MSI-H kebanyakan kurang terbukti mutasi jalur APC dan *beta-catenin*, lebih banyak menunjukkan mutasi K-ras yang juga sering terjadi pada HNPCC. Terdapat hal yang berbeda antara jalur familial HNPCC, rangkaian adenoma-karsinoma nonfamilial KKR tradisional, serta jalur alternatif *serrated*.

Dalam menangani penderita KKR selain klinis, demografi maupun riwayat keluarga, penting dilihat adanya fenotipe histologi maupun perubahanan gen yang sebenarnya. Hal ini untuk menghindari kekeliruan terapi, mencegah kekambuhan maupun menentukan prognosis penyakit. Adanya kelainan genetik pada keluarganya perlu diketahui untuk mencegah atau mengawasi manifestasi KKR di kemudian hari. Penelitian tentang kelainan genetik secara klinis terutama gen APC sebagai prekursor KKR FAP dan gen MSH sebagai dasar HNPCC baik pada pasien maupun keluarganya masih belum banyak dilakukan di Indonesia. Penelitian terdahulu di FKUI menunjukkan tidak terdapat perbedaan pola ekspresi protein MSH2 pada KKR usia muda dan tua serta adanya dugaan KKR sporadik di Indonesia terjadi pada usia yang lebih muda (Sudoyo AW 2005).

Telah diketahui daerah kelompok mutasi gen APC pada FAP terletak pada kromosom 5q21 (*codon* 1.286–1.513), *hot spot* KKR sporadik pada *codon* 1.554. Daerah ini merupakan daerah pengode domain yang akan berikatan dengan *catenin* Mutasi gen pada *Sindroma Lynch* / HNPCC yaitu hMSH2 pada kromosom 2p *exon* 21-22, merupakan daerah pengode motif *Walker A* yang penting untuk ikatan nukleotida (Kinzler KW, Vogelstein B 1996). *Sindroma Lynch* juga dapat berupa autosomal dominan gen hMLH1 pada 3p21, hMSH6 pada 2p16, hPMS1 pada 2q31, hPMS2 pada

7p22, dan TACSTD1 pada 2p21. MSH2 dan MLH1 adalah paling berhubungan dengan HNPCC. Mutasi MLH sering ditemukan pada KKR Sporadik (Turnpenny et al 2017).

Penelitian Yu dkk. pada 2016, menunjukkan ekspresi mRNA dari MLH1 pada darah tepi sebagai biomarker untuk diagnosis HNPCC. Aceto dkk. pada 2015, melakukan penelitian tentang korelasi antara mutasi dan ekspresi APC dan gen MUTYH sebagai pandangan baru untuk HNPCC. Sementara penelitian ekspresi MSH2 dan APC pada sel tumor bersamaan dengan darah sampai saat ini belum pernah dilaporkan.

Kebanyakan penelitian terdahulu terpusat pada *sekuensing* DNA poliformisme dan IHK sebagai dasar mutasi penyakit. Studi analisis ekspresi kuantitatif mRNA belum dilakukan dan kesalahan adalah jarang karena *proof reading* dan *repair mechanisms* berjalan secara halus. Editing RNA dilakukan oleh enzim dengan target mRNA *post-transkripsi* (Li M et al, 2011).

Skrining menggunakan Kriteria Amsterdam dan Bethesda untuk *Sindroma Lynch* sering sulit terutama pada keluarga kecil dan onset pada usia lanjut. Untuk menentukan risiko KKR herediter pada keluarga pasien diperlukan riwayat keluarga pada pedigree prinsip Mendel serta informasi ekspresi molekul gen herediter (Hamosch A et al 2016, Yang Y et al 2013, Biesecker LG et al 2014, Turnpenny PD et al 2017, Guttmacher AE et al 2016).

Perhitungan risiko KKR berulang pada anggota keluarga membutuhkan pengetahuan dasar teori probabilitas dan pengukuran gen herediter APC dan MSH2 pada *proband*. Teori Bayesian dapat memodifikasi risiko awal pedigree (*prio risk*) ditambah informasi kondisi (*conditional information*) untuk mendapatkan nilai probabilitas risiko KKR herediter (Guttmacher AE et al 2016, Brock JAK et al 2017, Bennett RL et al 2008, Turnpenny PD, 2017).

1.2. Rumusan Masalah

1. Usia penderita KKR di Indonesia rata-rata lebih muda yaitu 35-45 tahun pada wanita dan 55-65 tahun pada laki-laki.
2. *Gold standard* untuk menentukan KKR herediter sulit dilakukan secara klinis.
3. Klinis KKR sering tidak sesuai dengan fenotipe dan genotipe KKR.
4. Fenotipe kanker kolorektal yang ditemukan terkadang berbeda dengan genotipe KKR.
5. HNPCC maupun FAP dapat terjadi pada kasus tunggal dan usia tua. Hal ini akibat faktor herediter yang tersembunyi dengan risiko pengelolaan yang berbeda pada KKR.

1.3. Pertanyaan penelitian

1. Apakah penderita KKR dengan usia yang relatif muda di Indonesia dipengaruhi oleh faktor herediter?
2. Apakah ekspresi gen APC pada pasien KKR yang ditemukan berhubungan dengan faktor herediter?
3. Apakah ekspresi gen MSH2 pada pasien KKR berhubungan dengan faktor herediter?
4. Apakah ekspresi gen APC dan MSH2 yang ditemukan berhubungan dengan fenotipe KKR?
5. Apakah ekspresi gen APC dan MSH2 dapat menduga kemungkinan herediter pada subjek yang mempunyai riwayat keluarga KKR?

1.4. Hipotesis Penelitian

1.4.1. Hipotesis mayor:

1. terdapat faktor herediter pada sebagian KKR yang berhubungan dengan usia dan riwayat herediter;
2. terdapat hubungan antara ekspresi genotipe KKR dengan klinis dan fenotipe KKR.

1.4.2. Hipotesis minor:

1. terdapat ekspresi yang rendah gen APC dan MSH2 (darah dan jaringan) pada sebagian KKR muda di Indonesia sebagai faktor herediter;
2. terdapat hubungan faktor risiko klinis dan fenotipe KKR (usia, gender, letak tumor, *staging*, riwayat KKR, diferensiasi histopatologi) dengan faktor herediter berdasarkan ekspresi APC;
3. terdapat hubungan faktor risiko klinis dan fenotipe KKR (usia, gender, letak tumor, *staging*, riwayat KKR, diferensiasi histopatologi) dengan faktor herediter berdasarkan ekspresi gen MSH2;
4. terdapat hubungan faktor risiko klinis dan fenotipe KKR (usia, gender, letak tumor, *staging*, riwayat KKR, diferensiasi histopatologi) dengan faktor herediter berdasarkan ekspresi gen APC dan MSH2;
5. ekspresi APC dan MSH2 dapat menduga probabilitas pada keluarga (*Proband*) yang mempunyai riwayat KKR herediter.

1.5. Tujuan Penelitian

1.5.1. Tujuan Umum

Mengetahui ekspresi genetik APC dan MSH2 pada subjek kontrol non-KKR dan subjek KKR, serta hubungannya dengan fenotipe dan klinis KKR.

1.5.2. Tujuan Khusus

1. Mencari nilai ekspresi genotipe APC dan MSH2 pada subjek non-KKR dan kriteria titik potong sebagai parameter herediter .
2. Mengetahui kelainan ekspresi herediter gen supresor tumor APC dan gen MMR MSH2 pada jaringan dan darah subjek KKR.
3. Mengetahui hubungan ekspresi gen APC dan MSH2 herediter dengan risiko klinis dan fenotipe KKR.
4. Mencari cara untuk menentukan risiko berulang (*recurrence risk*) KKR herediter pada keluarga pasien.

1.6. Manfaat Penelitian

- 1.6.1. Mendapatkan nilai ekspresi gen herediter.
- 1.6.2. Secara klinis mendapatkan kelainan genetik herediter pada KKR untuk penanganan KKR lebih tepat seperti operasi total kolektomi untuk mencegah kekambuhan penyakit.
- 1.6.3. Untuk kepentingan pelayanan, penelitian ini dapat diaplikasikan secara klinis pada pasien maupun keluarganya dengan menduga besarnya risiko KKR berulang.
- 1.6.4. Untuk institusi pendidikan, pemeriksaan gen herediter pada KKR masih banyak yang dapat dipelajari dan diteliti serta sebagai bahan pelajaran bagi dokter serta para sejawat yang menangani pasien KKR.

B A B II

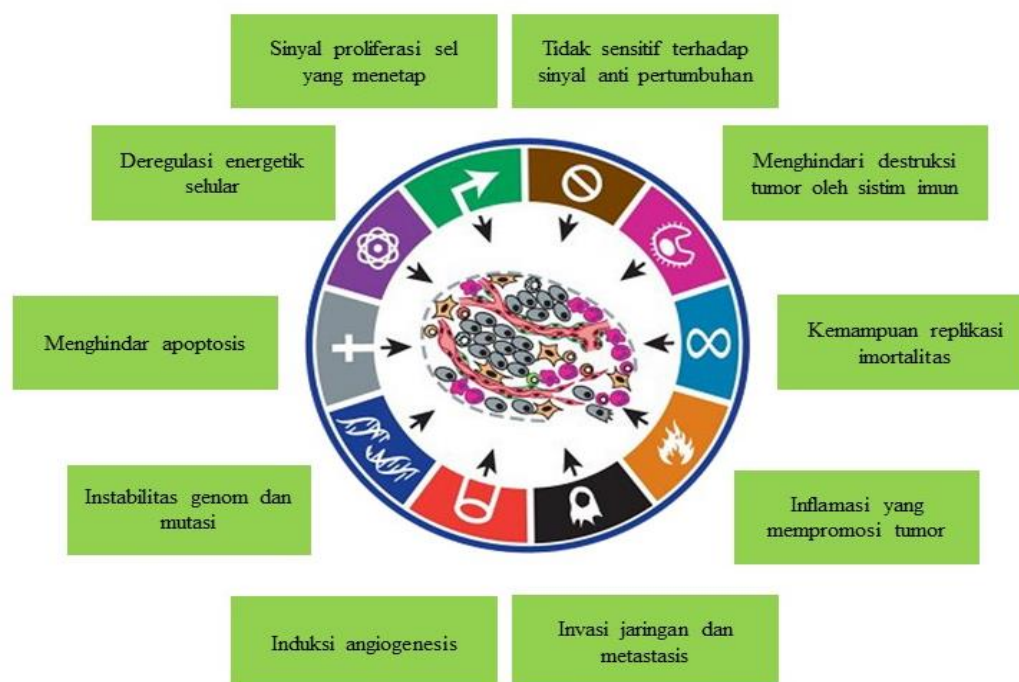
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kelainan Gen Terjadinya Kanker

Terjadinya tumor merupakan perubahan yang kompleks dan dinamik dengan adanya peningkatan produk onkogen dominan dan kehilangan fungsi tumor supresor gen secara resesif. Beberapa tipe kanker tergantung pada usia, terjadi akibat perubahan 4-7 gen sampai menjadi kanker yang invasif (Hanahan D and Weinberg RA 2000; Kinzler KW and Vogelstein B 1996).

2.1.1. Tahapan Perubahan Sel

Pada sel kanker terdapat kerusakan pada lingkaran yang mengatur perubahan proliferasi sel normal dan homeostasis. Sepuluh perubahan fisiologi sel bersama-sama mengatur pertumbuhan ganas, yaitu: 1. sinyal proliferasi sel yang menetap; 2. tidak sensitif terhadap sinyal antipertumbuhan (*antigrowth*); 3. menghindari apoptosis; 4. kemampuan replikasi immortalitas; 5. induksi angiogenesis; 6. Invasi jaringan dan metastasis; (Hahn WC et al. 1999; Bergers G et al. 1998) 7. menghindari destruksi tumor oleh sistem imun; 8. inflamasi yang mempromosi tumor; 9. instabilitas genom dan metastasis; 10. deregulasi energetik seluler; (Hanahan D and Weinberg RA 2000).



Gambar 1: Kemampuan sel kanker yang didapat. Diduga hampir seluruh sel kanker melalui mekanisme tersebut meskipun melalui berbagai mekanisme strategi. (Hanahan D and Weinberg RA 2000).

2.1.2. Kemampuan Mandiri Mencukupi Sinyal Pertumbuhan

Sel normal membutuhkan sinyal pertumbuhan mitogen (*growth signals/GS*) untuk proliferasi aktif. Sinyal ini mengikat molekul faktor pertumbuhan matriks ekstraseluler dan molekul adhesi/interaksi antarsel kemudian dipancarkan ke dalam sel melalui reseptor transmembran. Sel tumor membentuk sinyal pertumbuhan sendiri yang tidak tergantung faktor ekstraseluler dan lingkungan mikro jaringan tumor.

Tiga strategi untuk mencapai pertumbuhan otonom yaitu perubahan sinyal ekstraseluler, penghantar sinyal antarsel dan sirkuit sinyal intraseluler yang menerjemahkan sinyal tersebut untuk bekerja. Kebanyakan *mitogen growth factor* (GFs) dibuat oleh satu tipe sel dalam memberi perintah stimulasi proliferasi sel lain. Suatu proses dengan berbagai tipe sinyal (Fedi P et al. 1997).

Berbagai sel kanker mendapatkan kemampuan sintesis GFs yang berespons menciptakan lingkaran sinyal arus balik positif stimulasi otokrin. Pembuatan aGF (*autonomic GF*) sel kanker menyingkirkan ketergantungan GF dari sel lain dalam jaringan. Sebagai contoh produksi PDGF (*platelet-derived GF*) dan TGF α (*tumor growth factor α*) pada glioblastoma dan sarkoma (Fedi P et al. 1997).

Reseptor GF memengaruhi aktivitas tirosin kinase dalam sitoplasma dengan ekspresi yang berlebihan dalam sel kanker. Ekspresi berlebihan reseptor menyebabkan sel kanker hiperresponsif terhadap jumlah GF lingkungan yang secara normal tidak mencetuskan proliferasi. Contoh, reseptor epidermal GF (EGF-R /erbB) mengatur secara kuat pada tumor lambung, otak, dan payudara. Reseptor HER2/neu berekspresi berlebihan pada kanker lambung dan payudara. Ekspresi reseptor GF yang sangat berlebihan menyebabkan sinyal bebas ikatan (*ligand-independent*). Sinyal bebas ikatan juga didapatkan melalui perubahan struktur reseptor, seperti versi patahan pucuk reseptor EGF sangat kurang dipengaruhi oleh aturan umum sitoplasma (Fedi P et al. 1997).

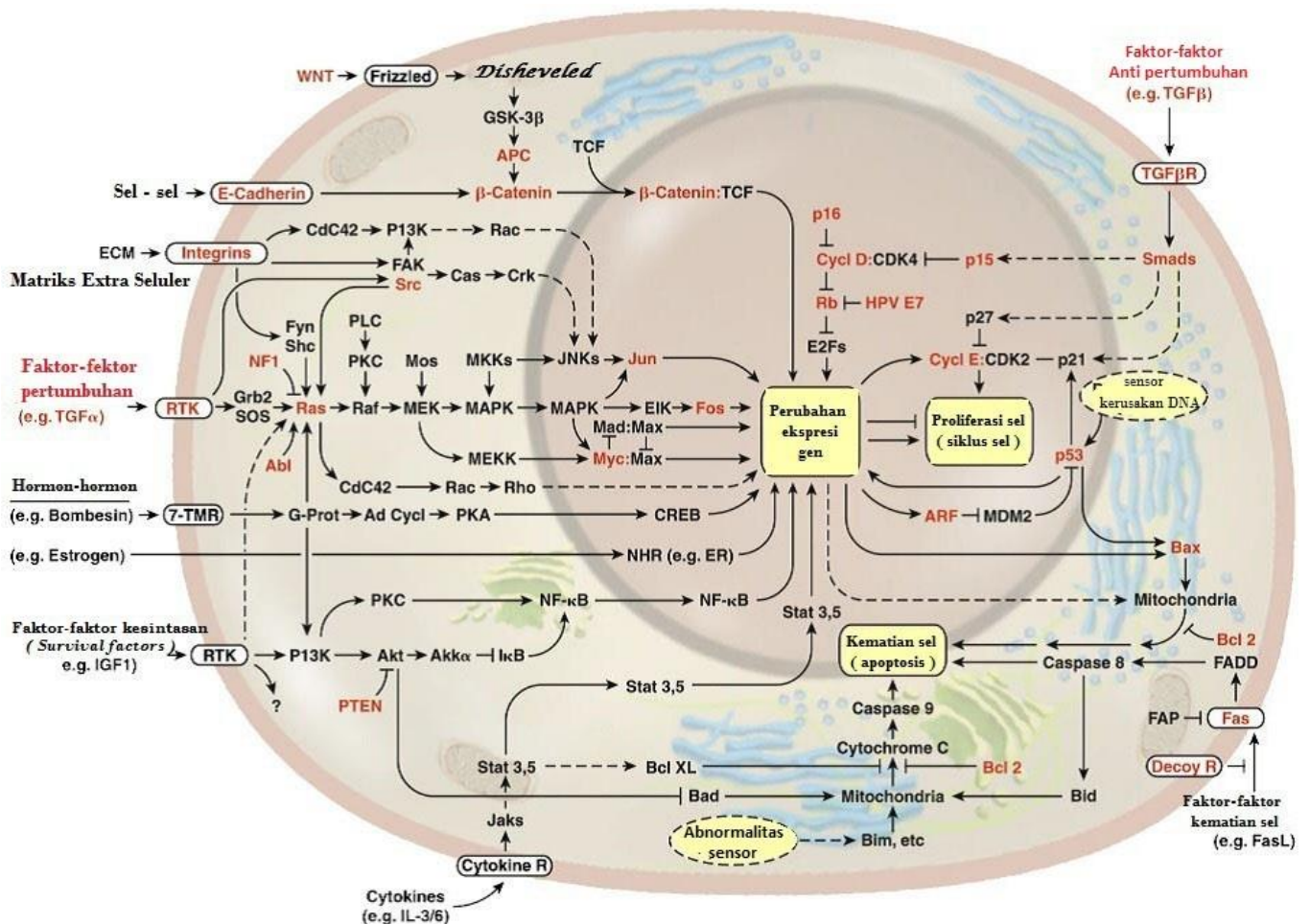
Sel kanker juga dapat mengubah tipe reseptor matriks ekstraseluler (ECM, *integrins*) yang mengirimkan sinyal pertumbuhan. Ikatan heterodimer reseptor permukaan sel terhadap sifat ECM yang spesifik ini menyebabkan reseptor integrin menghantar sinyal ke dalam sitoplasma untuk memengaruhi sifat sel dari keadaan tenang masuk ke dalam siklus sel aktif yang resistan terhadap apoptosis. Sebaliknya, kegagalan integrins menempe hubungan ekstrasel dapat merusak pergerakan sel, apoptosis dan istirahat sel. Kedua ikatan yang diaktifkan reseptor GF dan *progrowth integrin* bertautan dengan komponen ektramatriks yang mengaktifkan jalur kinase SOS-Ras-Raf-MAP (Lukashev ME and Werb Z 1998; Giancotti FG and Ruoslahti E 1999; Aplin AE et al. 1998).

Mekanisme paling kompleks dari otonom GS (*Growth Signal*) adalah perubahan penurunan regulasi (*down regulation*) sirkuit sitoplasma yang menerima dan memproses sinyal yang dipancarkan oleh ikatan aktif reseptor GF dan integrin. Kaskade SOS-Ras-Raf-MAPK berperan secara sentral. 25% tumor manusia terdapat struktur protein RAS yang berubah, terus menerus melepaskan sinyal mitogen ke dalam sel tanpa stimulasi yang normal. (Medema RH and Bos JL 1993). 50% KKR mengandung onkogen Ras mutan, sisanya berupa jalur sinyal pertumbuhan fenokopi aktivasi onkogen Ras (Kinzler KW and Vogelstein B 1996; Hunter T 1997).

Gambar berikut merupakan penelitian tiga dasawarsa sirkuit sinyal pertumbuhan pada sel mamalia. Jalur efektor baru yang diturunkan dan dipancarkan dari kaskade mitogen SOS-Ras-MAP kinase masih sedang diteliti. Kaskade ini berhubungan dengan berbagai koneksi jalur lain, memengaruhi efek biologi sel. Interaksi langsung protein Ras dengan PI3 kinase promosi kehidupan membangkitkan sinyal pertumbuhan bersama dalam sel (Hunter T 1997; Hanahan D and Folkman J 1996).

VEGF: *Vasculair Endothelial Growth Factor*

FGF1/2: *Acidic and basic fibroblast growth factors*

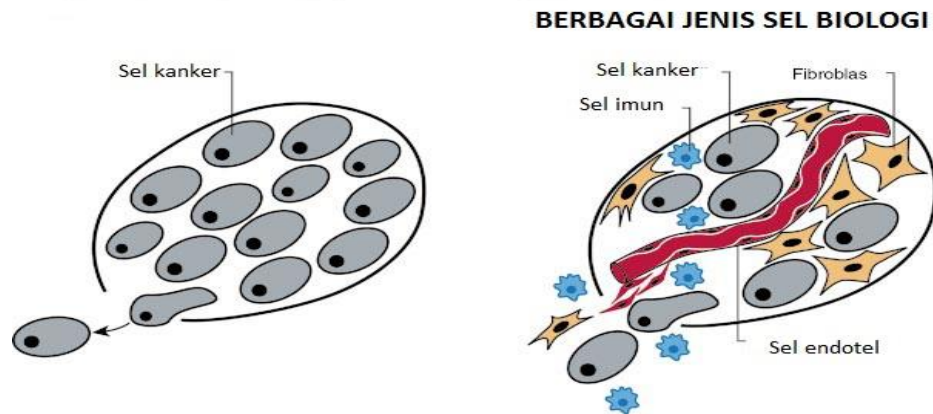


Gambar 2. Sirkuit terintegrasi dari sel.

Perkembangan sel dalam memilah jalur sinyal menyusun sirkuit yang mirip sirkuit elektronik terintegrasi yang rumit. Di sini transistor digantikan oleh protein (seperti kinase dan fosfatase) dan elektron digantikan oleh fosfat dan lipid. Prototipe sinyal sirkuit pertumbuhan terpusat sekitar Ras dan berpasangan dengan spektrum dari isyarat ekstraseluler, komponen sirkuit lain menghantar sinyal antipertumbuhan dan diferensiasi yang memperantarai komando untuk hidup atau mati oleh apoptosis. Sebagai reprogram genetik dari sirkuit terintegrasi dalam sel kanker, sebagian gen yang fungsinya berubah ditandai warna merah (Hanahan D and Weinberg RA 2000).

2.1.3. Tumor sebagai Jaringan yang Kompleks

Dalam jaringan kompleks tumor sel kanker yang mutan, sel normal diwajibkan bekerja sama dalam agenda neoplasma. Interaksi genetik sel ganas dan pendukungnya yang berkomplot penting untuk mengetahui patogenesis kanker dan terapi yang efektif (Hanahan D and Folkman J 1996).



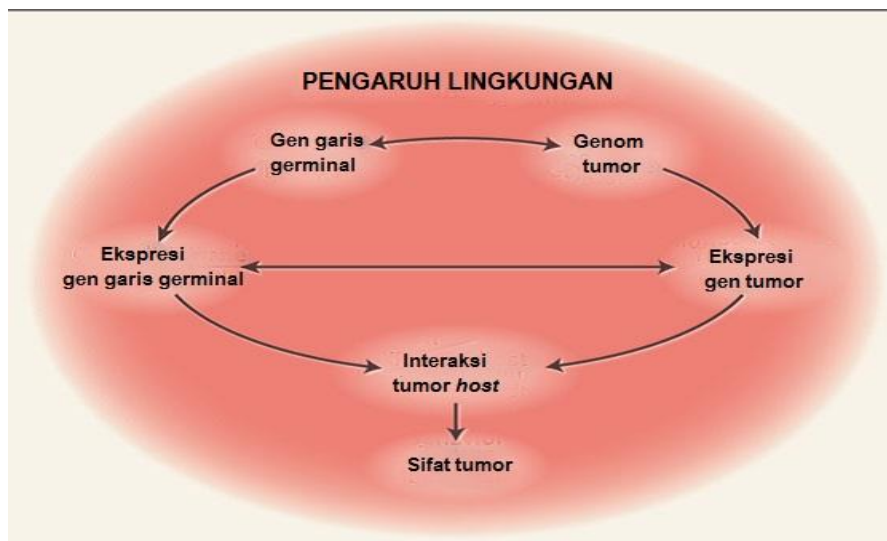
Gambar 3. Jaringan kompleks tumor.

Terdapat penyimpangan dari sel atau jaringan dekat sel tumor seperti fibroblas dan sel endotel yang berperan mengarahkan proliferasi sel tumor. Dalam jaringan tumor sel-sel normal diinstruksikan melalui sinyal parakrin tetangganya atau sinyal sistemik endokrin. Berbagai tipe sel berkomunikasi melalui berbagai sinyal pertumbuhan *Growth Signal* (GS) otonom. (Hanahan D and Folkman J 1996). Lebih jauh sel radang yang ditarik meningkatkan sel kanker daripada mengeliminasi (Hanahan D and Weinberg RA 2000; Downward J 1998; Olumi AF et al. 1999; Cordon-Cardo C and Prives C 1999; Coussens LM and Werb Z 1996; Hudson JD et al. 1999).

2. 2. Dasar Molekular Kanker Kolon

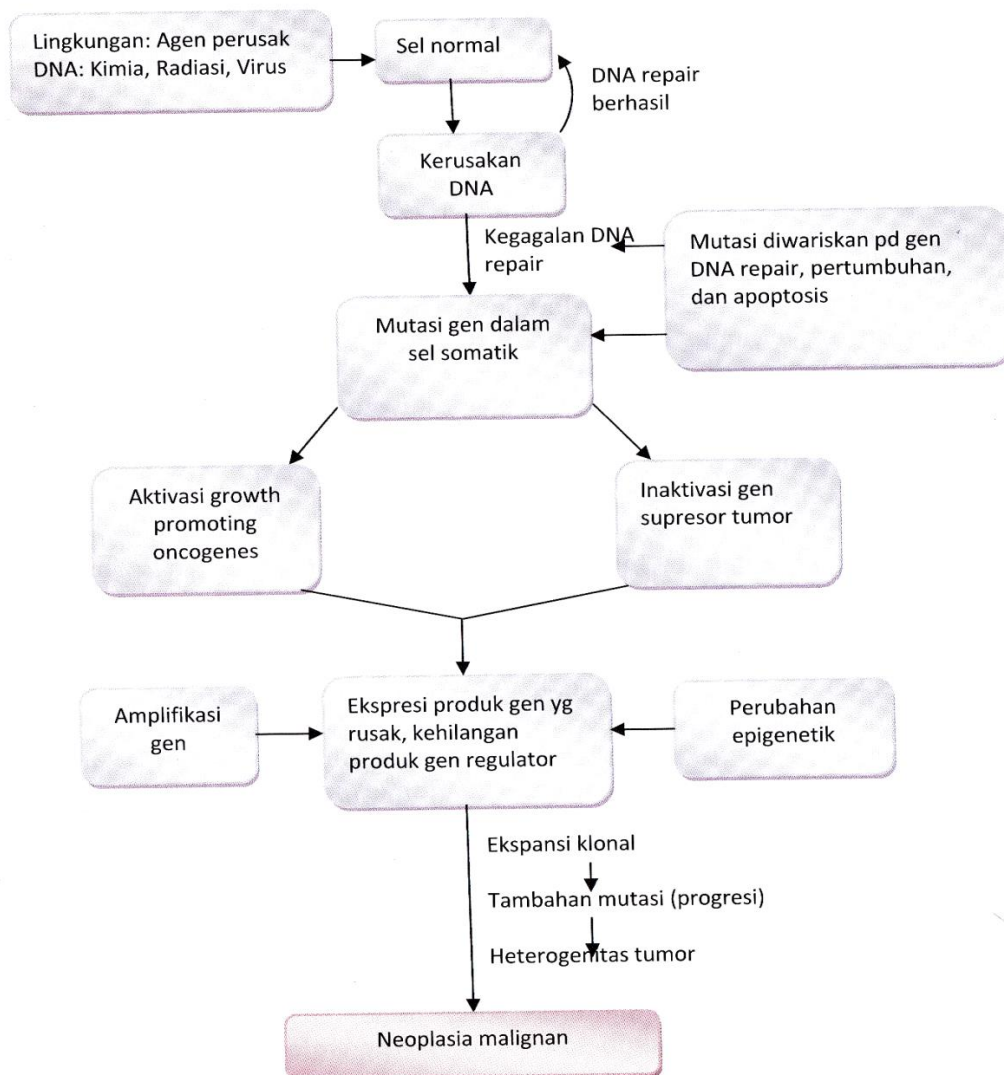
Kanker Kolorektal (KKR) biasanya diawali dengan polip adenoma jinak, yang berkembang menjadi adenoma lanjut, displasia berat, dan kanker invasif. KKR dapat terbatas pada dinding kolon (TNM stadium I dan II) atau menyebar ke kelenjar regional (stadium III) dan metastasis jauh (stadium IV). Tumor stadium I dan II dapat diobati dengan bedah eksisi, 73 % kasus stadium III dapat diobati dengan kombinasi bedah dan kemoterapi adjuvan. KKR pada stadium IV kemoterapi dapat memperbaiki *survival* meskipun sudah tidak dapat diobati dengan tuntas (Jemal A et al. 2008; Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Libutti SK et al. 2008; Compton C et al. 2008; Markowitz SD et al 2002; Andre T et al. 2004).

Penting mengetahui dasar molekular seseorang yang cenderung mengalami kanker kolorektal dan menentukan faktor yang mengawali tumbuhnya tumor, hal yang menjadikan tumor menjadi progresif dan menentukan responsif atau resisten terhadap obat antitumor. Berikut adalah pengetahuan dasar dari sebagian biomolekular kanker kolon.



Gambar 4. Multifaktor Karsinogenesis Kolorektal (Markowitz SD and Bertagnolli MM 2009).

Kejadian molekular yang merancang permulaan, promosi, dan progresi KKR terjadi pada beberapa tingkat hubungan. Proses dinamik ini mencakup interaksi antara pengaruh lingkungan dan faktor garis germinal yang menentukan kemungkinan kanker pada seseorang, serta akumulasi perubahan somatik pada epitel kolorektal.



Gambar 5. Perubahan genetik dan epigenetik akibat zat perusak DNA berakibat Karsinogenesis (Kresno SB 2011).

2.2.1. Instabilitas Genomik Kanker Kolorektal

Kehilangan stabilitas genom pada KKR menyebabkan berkembangnya KKR dengan memfasilitasi akuisisi berbagai mutasi yang berhubungan dengan tumor.

2.2.1.1. Instabilitas Kromosom

Instabilitas genomik pada kanker kolon umumnya adalah instabilitas kromosom, yang menyebabkan sejumlah perubahan pada jumlah kopi dan struktur kromosom. Instabilitas kromosom merupakan mekanisme efektif yang menyebabkan kehilangan secara fisik kopi "tipe *wild*" gen supresor tumor, seperti APC, *p53*, dan kelompok 4 SMAD (SMAD4). Gen-gen tersebut dalam keadaan normal melawan fenotipe ganas (Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Grady WM and Markowitz S 2002; Fearon ER and Bommer GT 2008). Pada KKR terdapat inaktivitas (mutasi) sejumlah gen yang dalam keadaan normal berfungsi mempertahankan stabilitas kromosom saat replikasi.

Berbagai mutasi bersama-sama berperan dalam instabilitas kromosom (Barber TD et al. 2008). Berbeda dengan kanker lain, kanker kolorektal jarang melibatkan amplifikasi sejumlah kopi gen atau pengaturan ulang gen (Leary RJ et al. 2008).

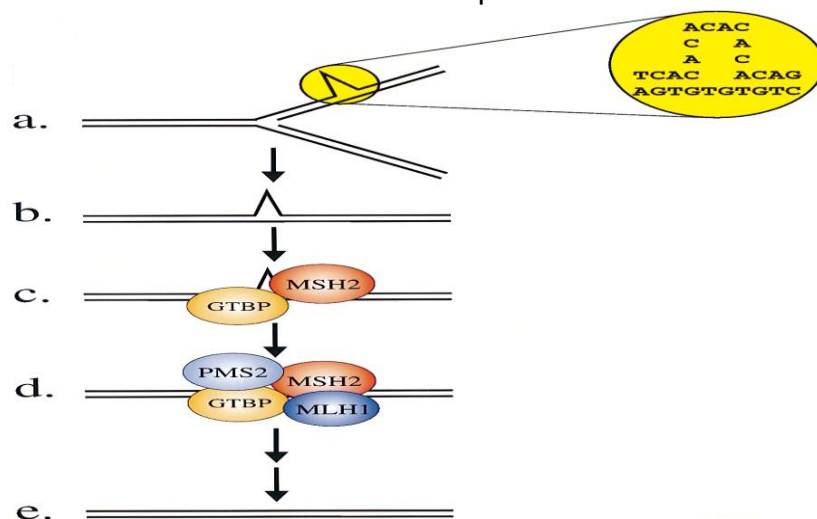
2.2.1.2. Defek DNA Repair

Pada sekelompok penderita KKR, terdapat inaktivasi gen yang berfungsi memperbaiki pasangan yang salah dari basa DNA (*base-base mismatches*), yang dikelompokkan sebagai *mismatch-repair gene*. Inaktivasi ini dapat diturunkan (*inherited*) seperti pada *Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer* (HNPCC) sebagai *Lynch syndrome*, atau didapat seperti metilasi yang meredam gen yang mengodekan protein dari DNA *mismatch-repair* (Leach FS et al. 1993; Papadopoulos N et al. 1994; Fishel R et al. 1994; Bronner CE et al. 1994). Pada HNPCC, *defek Mismatch-repair gene* (gen MMR) terjadi pada jalur benih (*germ-line*) terutama pada MLH1 dan MSH2. Hal ini menyebabkan risiko KKR sepanjang hidup sebesar 80%, dengan usia rata-rata 45 tahun (Evan G 1998; Jemal A et al. 2008; Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Libutti SK et al. 2008; Lynch HT et al. 2008; Boland CR et al. 2008). Kehilangan fungsi MMR pada HNPCC tidak hanya akibat mutasi pada *germ-line mismatch repair gene*, tetapi juga inaktivasi somatik dari *alel parental* yang *wild type* (Boland CR et al. 2008). Instabilitas genomik berasal dari defisiensi *mismatch-repair* yang secara dramatis mempercepat terjadinya kanker pada HNPCC. Sebagian kanker terjadi 36 bulan setelah pemeriksaan kolonoskopi yang normal (Jarvinen HJ et al. 2000). Untuk hal ini, maka kolonoskopi tiap tahun dianjurkan pada karier mutasi HNPCC, serta dipertimbangkan profilaksi kolektomi pada displasia derajat berat. Gen MSH6, mutasi garis germinal gen *mismatch repair* lain kurang predisposisi kanker familial (Miyaki M et al. 1997; Kastrinos F and Syngal S 2007; Kolodner RD et al. 1999). Inaktivasi somatik gen *mismatch repair* terjadi pada 15% pada KKR nonfamilial. Pada penderita ini, peredaman bialel dari daerah promotor gen MLH1 oleh metilasi akan menghilangkan aktivitas gen MMR (Kane MF et al 1997; Herman JG et al. 1998; Veigl ML et al. 1998).

Kehilangan fungsi perbaikan pasangan (*Mismatch Repair/MMR*) mudah dikenali dari epifenomenon instabilitas mikrosatelit. Di sini terdapat ketidakmampuan gen dalam memperbaiki untaian yang salah saat pengulangan elemen sekuens DNA serta dalam mengubah ukuran pengulangan mononukleotida atau dinukleotida (mikrosatelit). Defisiensi MMR dapat juga dideteksi melalui analisis imunohitokimia, di mana terdapat kehilangan salah satu protein MMR (Lonov Y et al. 1993; Thibodeau SN et al. 1993; Aaltonen LA et al. 1993; Hampel H et al. 2005). Kanker kolon dengan defisiensi MMR pada kasus-kasus sporadik terutama, terletak pada tumor di kolon proksimal, berhubungan dengan usia lanjut dan seks wanita (Weisenberger DJ et al. 2006). Pada defisiensi *mismatch repair*, gen-gen tumor supresor seperti TGF- β (*Transforming growth factor*), TGFBR2 (TGF β reseptor tipe II), BAX (BCI2-associated X protein), yang berfungsi lokal perbaikan sekuens mononukleotida atau dinukleotida berulang dinonaktifkan (Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Grady WM and Markowitz S 2002; Fearon ER and Bommer GT 2008).

Rute alternatif KKR adalah melalui inaktivasi garis germinal (*germ-line*) pada gen perbaikan eksisi basa, mutY *homologue* (MUTYH) yang juga disebut MYH. Protein MYH didapat dari DNA 8-oxoguanine produk dari kerusakan oksidatif *guanine* (Jones S et al. 2002; Al-Tassan N et al. 2002; Kastrinos F and Syngal S 2007). Pada orang dengan 2 alel MYH garis benih yang tidak aktif, akan terjadi poliposis dengan risiko KKR mendekati 100% pada usia 60 tahun. 1/3 adenoma kolorektal menunjukkan poliposis yang berhubungan dengan MYH. Diagnosisnya membutuhkan tes genetik yang difasilitasi 2 mutasi Y165C dan G382D pada 85% kasus (Kastrinos F and Syngal S 2007).

Gambar 6. Jalur Gen MMR pada sel manusia.



Gambar: (a dan b) Selama replikasi DNA normal, salah pasangan basa tunggal dapat akibat kesalahan penggabungan oleh polimerase-polimerase (tidak tampak) dan kesalahan pasangan yang besar dapat akibat kesalahan deretan/untaian (warna kuning). (c) Akibat kesalahan pasangan (*mismatch*) diketahui oleh mutS homolog. Pada manusia, pengenalan kesalahan pasangan secara optimal dibutuhkan paling sedikit 2 mutS homolog, MSH2, dan GTBP. Pada kasus tertentu MutS homolog MSH3 dapat ditambahkan pada GTBP (Palombo dkk, 1996). (d dan e) MutL homolog kemudian direkrut ke dalam kompleks (d) dan kesalahan pasangan (e) diperbaiki melalui proses yang melibatkan aksonuklease, helikase II, DNA polimerase III, protein pengikat (e) (Kinzler KW and Volgenstein B 1998).

2.2.1.3. Metilasi DNA Aberan

Mekanisme lain pada KKR adalah epigenetik peredaman (*silencing*) gen yang kebanyakan diperantarai oleh metilasi DNA aberan (Lukashev ME and Werb Z 1998; Kondo Y and Issa JP 2004). Bentuk metilasi dari *cytosine* dimana grup metil melekat pada karbon 5 (*5-methylcytosine*) melalui perantara enzim DNA *Methyl Transferase* (DNMT). Pola metilasi dalam keadaan normal dipertahankan selama hidup individu yang bersangkutan. Metilasi DNA merupakan regulator kunci transkripsi gen dan stabilitas genom. Pada karsinogenesis, umumnya pola metilasi terganggu. Banyak yang menunjukkan hipometilasi global dan hipermetilasi regional beberapa sekuens promotor gen. Perubahan metilasi promotor gen supresor menyebabkan tidak terekspresikannya gen yang bersangkutan. Hipermetilasi DNA secara khas terjadi pada pulau-pulau CpG dihubungkan dengan inaktivitas gen. Pulau CpG adalah fraksi kecil dalam genom yang terdiri dari untaian pendek DNA dengan densitas CpG tinggi

(*CpG rich area*) yang sebagian besar bebas metilasi. Regio promotor gen yang aktif bertranskripsi mengandung banyak CpG. 60% genom manusia berhubungan dengan pulau-pulau CpG dengan metilasi yang spesifik untuk tiap jaringan. Pada penuaan atau kanker, beberapa pulau mengalami hipermetilasi.

Pada KKR sporadik dengan instabilitas mikrosatelit, peredaman epigenetik somatik menghambat ekspresi MLH1. Sebuah subgrup kanker kolorektal yang mengalami metilasi aberan disebut *CpG Island Methylator Phenotype* (CIMP atau CIMP-high). Hal ini terdapat pada 15% KKR (Issa JP 2004; Toyota M et al. 1999; Nosho K et al. 2008; Weisenberger DJ et al. 2006) (Gambar 6). Konsekuensi patogenetik peredaman MLH1 telah diketahui, tetapi pada KKR herediter masih dalam penelitian. Metilasi aberan tingkat *intermediate* (subgrup CIMP2 dan CIMP-low) terdapat pada 30% kasus-kasus CIMP. Bentuk ketiga metilasi aberan terjadi pada exon 1 gen yang mengodekan vimentin. Lokus ini tidak diekspresikan pada mukosa usus normal, tetapi terjadi pada 53 -83% KKR yang bebas CIMP (Chen WD et al. 2005; Zou H et al. 2007).

2.2.2. Inaktivasi Mutasi Gen Supresor Tumor

2.2.2.1. Adenoma Polyposis Coli (APC)

Kanker kolorektal memerlukan beberapa perubahan genetik, tetapi jalur sinyal tertentu jelas sebagai faktor kunci dalam pembentukan tumor (gambar 6). Salah satu dari perubahan ini adalah aktivasi jalur signal Wnt, yang dianggap mengawali kejadian kanker kolorektal. Sinyal Wnt terjadi jika *oncoprotein β -catenin* terikat pada pasangan inti (anggota faktor sel-T limfosit penguat faktor keturunan) membentuk transkripsi faktor yang mengatur gen yang terlibat aktivasi seluler. Kompleks degradasi *β -catenin* mengontrol tingkat protein *β -catenin* melalui proteolisis. Kompleks APC ini tidak hanya mendegradasi *β -catenin*, tetapi juga menghambat lokalisasi inti. (Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Fearon ER and Bommer GT 2008).

Mutasi terbanyak pada KKR umumnya inaktivasi gen yang mengodekan protein APC. APC terlibat dalam sinyal Wnt, regulasi siklus sel, stabilisasi mikrotubular sitoskeleton, interaksi antarsel melalui *β -catenin* dan mungkin apoptosis. Dengan hilangnya fungsi APC maka penghancuran *β -catenin* sinyal Wnt tidak terjadi sehingga sinyal terus menerus aktif. Mutasi garis-benih APC meningkatkan adenoma poliposis familial, suatu sindrom predisposisi kanker herediter. Adanya karier dari gen mutan meningkatkan risiko KKR pada usia 40 mencapai hampir 100%. Mutasi somatik dan delesi yang menginaktivasi kedua kopi gen APC terjadi pada kebanyakan adenoma kolorektal sporadik dan KKR. Pada sekelompok kecil tumor dengan *wild-type* APC, adanya mutasi *β -catenin* menimbulkan protein yang resisten terhadap kompleks degradasi *β -catenin* pada aktivasi sinyal Wnt (Korinek V et al. 1997; Morin PJ et al. 1997; Goss KH and Groden J 2000).

Gen APC terletak pada kromosom 5q21 yang disebut gen *adenomatous polyposis coli* (Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Lynch HT et al. 2008; Goss KH and Groden J 2000). Gen ini terbukti menunjukkan *germ-line mutation* pada pasien FAP dan keluarganya. Gen ini terdiri dari lebih dari 300 kilobasa, dengan daerah kodon 8.532

bp tersebar lebih dari 15 exon. Lebih dari 80% mutasi *missense* atau *nonsense* terletak pada kodon 1.285 dan 1.465 pada exon 15. Terdapat dua rangkaian mRNA yang dihasilkan oleh sambungan alternatif. Rangkaian yang umum adalah lebih dari 300 bp dengan mengodekan protein dari 2.843 asam amino (Goss KH and Groden J 2000).

Gen lain yang terletak pada kromosom 5q disebut gen *mutated in colon carcinoma* (MCC), yang menunjukkan mutasi pada sekitar 55% KKR. Beberapa peneliti menduga gen APC dan MCC membentuk heterodimer (Kinzler KW and Vogelstein B 2002).

2.2.2.2. TP53

p53 yang *wild-type* memerantarai penghentian siklus sel dan *check-point* kematian sel yang diaktifkan oleh berbagai stres sel. Inaktivasi TP53 sering bersamaan saat transisi adenoma besar menjadi karsinoma yang invasif (Jass JR 2007; Liaw D et al. 1997; Marsh DJ et al. 1997; Yin Y and Shen WH 2008; Vazquez A et al. 2008; Baker SJ et al. 1990). Inaktivasi jalur p53 oleh mutasi TP53 adalah kunci tahap kedua KKR. Pada kebanyakan tumor, kedua allel TP53 dinonaktifkan, biasanya oleh kombinasi mutasi *missense* yang menonaktifkan transkripsi aktif p53 dan delesi kromosom 17p yang mengeliminasi allel TP53 (Kinzler KW and Vogelstein B 2002; Grady WM and Markowitz S 2002; Fearon ER and Bommer GT 2008; Baker SJ et al. 1989; Baker SJ et al. 1990; Malkin D et al. 1990). Pada beberapa KKR dengan *defek* MMR TP53, tetap *wild-type* sehingga dipikirkan pada kanker ini aktivitas jalur p53 mungkin diperkuat oleh mutasi pada induksi BAX dari apoptosis (Vazquez A et al. 2008).

2.2.2.3. Jalur Supresor Tumor TGF- β

Mutasi inaktivasi sinyal TGF- β adalah tahap ketiga dari progresivitas KKR. Pada tumor dengan *defek* MMR, TGFBR2 dinonaktifkan secara jelas oleh mutasi *frameshift* pada pengulangan *polyadenine* dalam kode sekuens TGFBR2. Minimal setengah dari KKR dengan *wild-type mismatch repair*, sinyal TGF- β hilang oleh inaktivasi mutasi *missense* yang memengaruhi TGFBR2 kinase, atau mutasi dan delesi menonaktifkan jalur turunan TGF- β komponen SMAD4 atau faktor-faktor pasangan transkripsinya SMAD2 dan SMAD3. Mutasi yang menginaktifkan jalur TGF- β terjadi pada transisi dari adenoma menjadi displasia derajat berat atau karsinoma. (Leary RJ et al. 2008; Markowitz S et al. 1995; Grady WM et al. 1999; Parsons R et al. 1995; Grady WM and Markowitz SD 2008; Thiagalingam S et al. 1996; Sjolbom T et al. 2006; Wood LD et al. 2007; Eppert K et al. 1996; Riggins GJ et al. 1996).

2.2.3. Jalur Aktivasi Onkogen

2.2.3.1. RAS dan BRAF

Beberapa onkogen berperan penting dalam mencetuskan kanker kolorektal (gambar 2). Mutasi onkogen RAS dan BRAF mengaktifkan jalur sinyal *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK). Pada KKR, terjadi mutasi pada 37% RAS dan 13% BRAF. Mutasi RAS terutama KRAS, mengaktifkan GTP-ase yang memberi sinyal langsung pada RAF. Mutasi BRAF memberi sinyal aktivitas pada *BRAF Serine-threonine Kinase*, yang selanjutnya mengarahkan sinyal kaskade MAPK. Mutasi BRAF terdeteksi

bahkan pada polip kecil, sedangkan mutasi RAS lebih sering terjadi pada polip hiperplastik, adenoma serata serta kanker kolon proksimal, terutama pada fenotipe CIMP. Penderita dengan lesi hiperplastik yang besar dan banyak yang disebut sindrom poliposis hiperplastik mempunyai risiko KKR dengan progresivitas melalui lesi perantara yang pada histologi menunjukkan batas lumen yang serata (Nosho K et al. 2008; Bos JL et al. 1987; Davies H et al. 2002; O'Brien MJ 2007; Rajagopalan H et al. 2002; Siena S et al. 2009) (Downward J 1998; Bos JL et al. 1987; Aoki Y et al. 2008;).

2.2.3.2. Phosphatidylinositol 3 Kinase

Sepertiga KKR mengalami mutasi somatik PI3KCA, yang mengodekan subunit katalitik *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) (Samuels Y et al. 2004). Lebih jarang perubahan genetik yang menggantikan mutasi PI3KCA termasuk hilangnya PTEN, suatu inhibitor sinyal PI3KCA, seperti amplifikasi *insulin reseptor substrate 2* (IRS2), suatu activator sinyal PI3K dan koamplifikasi AKT dan PAK4 yang memediasikan sinyal PI3K (Parsons DW et al. 2005).

2.2.4. Sequencing Genom Kanker Kolorektal

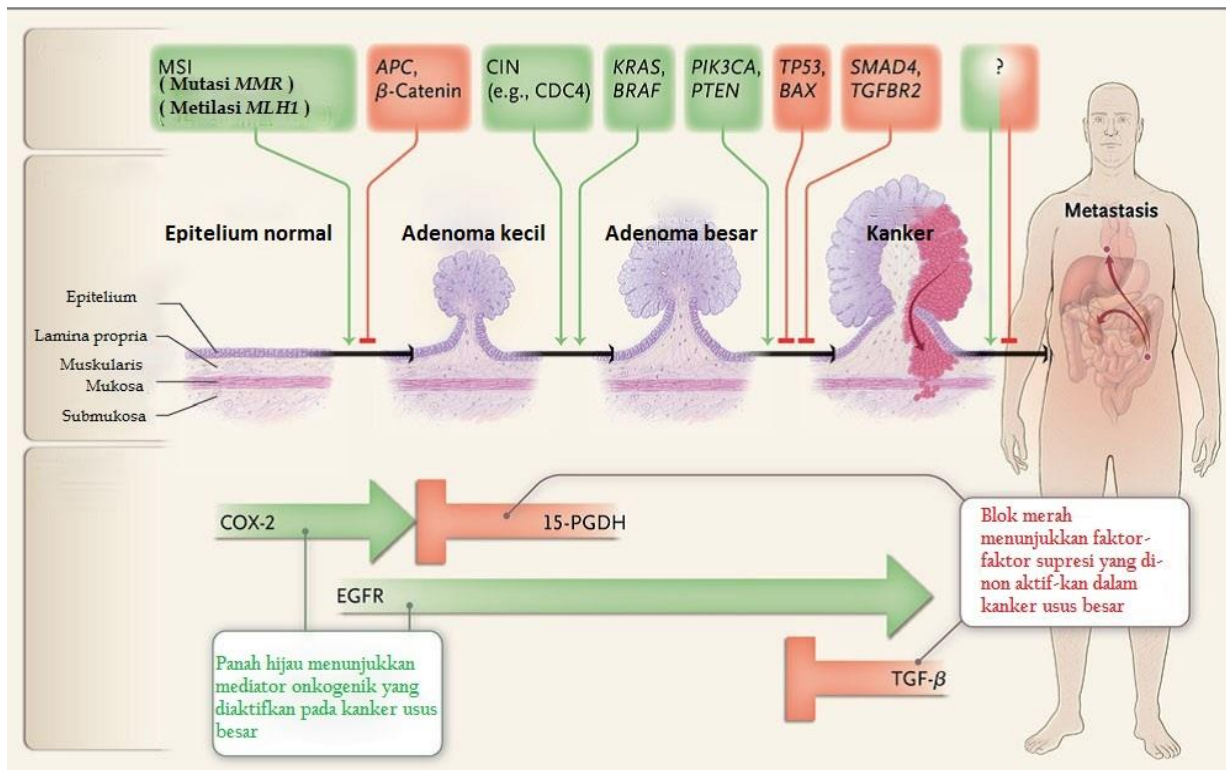
Dengan teknik mutahir *sequencing* tinggi sampai 18.000 *reference sequence* data dasar dari Pusat Nasional Informasi Bioteknologi telah diidentifikasi sejumlah 848 gen mutasi somatik pada kanker, di antaranya sejumlah 140 kandidat gen kanker yang berperan pada fenotipe KKR. Mungkin lebih banyak lagi mutasi yang diharapkan. Pada stadium IV KKR, rata-rata terdapat 15 kandidat gen kanker dan 61 *passenger genes* yang bermutasi. Yang paling menonjol adalah mutasi gen dengan frekuensi yang jarang. Hal ini mengakibatkan heterogenitas yang luas pada KKR serta mencerminkan heterogenitas klinis dari kanker kolorektal.

Tingkat heterogenitas ini menyebabkan kesulitan dalam menentukan efek klinis dari mutasi individu. Lebih jauh, mutasi penumpang yang jarang ini sering tampak pula pada kanker lain. Contoh mutasi IDH1 tercatat awalnya pada kanker kolorektal namun kemudian ditemukan pada beberapa glioma. *Sequencing* tingkat tinggi gen KKR telah mengidentifikasi target mutasi umum yang baru. Di sini termasuk *Ephrin receptor* EPHA3 dan EPHB6 (*Receptor Tyrosine Kinase*), yang bermutasi pada 20% KKR. FBXW7 yang berfungsi pada jalur degradasi protein yang mengatur tingkat *cyclin E* yang bermutasi pada 14% KKR. Tantangan yang penting adalah mengurangi kompleksitas dari kandidat 140 gen kanker (Sjoblom T et al. 2006; Wood LD et al. 2007; Rajagopalan H et al. 2004; Parson DW et al. 2008).

2.2.5. Perubahan Genomik Dan Progresivitas Tumor

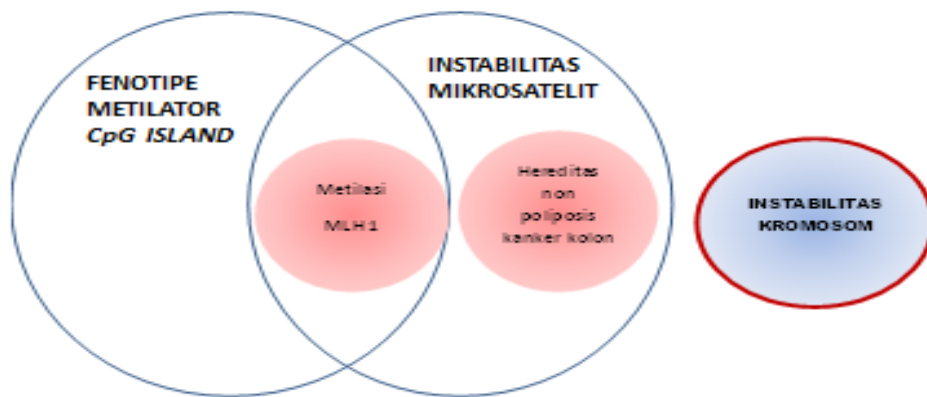
Rangkaian transformasi dari adenoma ke karsinoma adalah contoh perkembangan KKR, terdapatnya mutasi promoting tumor spesifik. Hal ini menduga adanya mutasi yang memberi perintah bersifat tumor seperti metastasis regional atau metastasis jauh (gambar 1 dan gambar 7). Hasil uji rangkaian genom secara penuh (*full genome sequencing*) menunjukkan bahwa pada KKR primer dan metastasis jauh pada penderita yang sama tidak menunjukkan adanya mutasi yang baru pada metastasis.

Hal ini menunjukkan bahwa mutasi baru tidak diperlukan untuk sel tumor mampu meninggalkan tumor primer dan menyebar jauh serta dalam waktu yang cepat kurang dari 24 bulan dari mutasi akhir pada tumor primer (Jones S et al. 2008).



Gambar 7. Gen dan jalur faktor pertumbuhan (*Growth Factor Pathway*) yang menggerakkan progresivitas KKR (Markowitz SD and Bertagnolli MM 2009).

Dalam perkembangan KKR, perubahan target genetik pada bagian atas dari diagram. Jalur MSI (*Microsatellite Instability*) diawali oleh mutasi gen MMR (*Mismatch Repair Gene*) atau metilasi aberan MLH1 yang kemudian dihubungkan dengan mutasi ke bawah pada TGF- β 2 dan BAX. Metilasi MLH1 aberan dan mutasi BRAF masing-masing dihubungkan dengan jalur *serrated-adenoma*. Masalah perubahan genetik atau epigenetik yang spesifik untuk progresivitas metastasis belum diidentifikasi. Kunci jalur faktor pertumbuhan yang berubah selama neoplasma kolon tampak pada bagian bawah diagram. CIN menunjukkan *chromosome instability*, EGFR *epidermal growth factor receptor*, 15-PGDH *15-prostaglandin dehydrogenase*, TGF- β *transforming growth factor β* .



Gambar 8. Jalur Instabilitas Genetik yang mengarah ke Neoplasma Kolon (Markowitz SD and Bertagnolli MM 2009).

Hubungan tumpang tindih yang menentukan jalur utama instabilitas genomik pada KKR: instabilitas kromosom dan instabilitas mikrosatelit disebabkan *defek* gen MMR DNA baik hereditas *defek* garis germinal (seperti HNPCC) atau didapat somatik (seperti metilasi aberan dan epigenetik peredaman MLH1), serta fenotipe metilasi *CpG island*.

2.2.6. Jalur Faktor Pertumbuhan (*Growth Factor*)

2.2.6.1. Regulasi Aberan Sinyal Prostaglandin

Aktivasi jalur *growth factor* adalah umum pada kanker kolorektal (Gambar 7). Pada awal dan tahap kritis perkembangan adenoma adalah aktivasi sinyal prostaglandin. Respons abnormal diinduksi oleh radang atau mitogen dengan regulasi yang meningkat dari COX-2, enzim yang menginduksi sintesis prostaglandin E₂, bahan yang kuat hubungannya dengan KKR (Markowitz SD 2007; Cha YI and DuBois RN 2007). Aktivitas prostaglandin E₂ juga meningkat dengan hilangnya aktivitas 15-*prostaglandin dehydrogenase* (15-PGDH), enzim katalisis degradasi prostaglandin (Yan M et al. 2004; Myung SJ et al. 2006; Backlund MG et al. 2005). Meningkatnya COX-2 ditemukan pada 2/3 KKR dan hilangnya 15-PGDH pada 80% adenoma kolorektal dan KKR (Yan M et al. 2004). Percobaan klinis menghambat COX-2 oleh NSAID dapat mencegah berkembangnya adenoma baru (Chan AT et al. 2007; Baron JA et al. 2003; Sandler RS et al. 2003; Bertagnolli MM et al. 2006; Arber N et al. 2006) dan memperantarai regresi adenoma yang sudah ada (Steinbach G et al. 2000).

2.2.6.2. Reseptor Faktor Pertumbuhan Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor/ EGF*)

Faktor pertumbuhan epidermal adalah protein yang larut dan mempunyai efek buruk pada sel usus. Studi klinis menunjukkan pengaturan sinyal yang penting melalui reseptor EGF (EGFR) pada subgrup kolorektal kanker (Saltz LB et al 2004; Cunningham D et al. 2004; Meyerhardt JA and Mayer RJ 2005; Van Cutsem E et al. 2007). EGFR memperantarai sinyal-sinyal dengan mengaktifkan kaskade sinyal MAPK dan PI3K. Data klinis akhir-akhir ini menunjukkan bahwa kanker kolorektal

lanjut adalah adanya mutasi melalui jalur ini, termasuk aktivasi mutasi KRAS (Amado RG et al. 2008; Lievre A et al. 2008; Karapetis CS et al. 2008), BRAF (Di Nicolantonio F et al. 2008; Wong R and Cunningham D 2009), dan subunit p110 PI3K (Jhawer M et al. 2008) serta tidak terdapat respons terhadap terapi anti-EGFR.

2.2.6.3. Faktor Pertumbuhan Endotel Vaskuler (*Vascular Endothelial Growth Factor/ VEGF*)

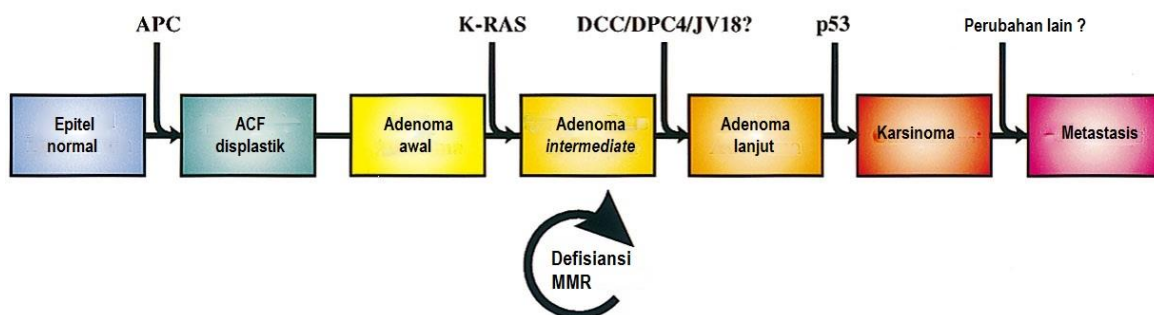
Faktor pertumbuhan ini (VEGF) diproduksi pada saat terjadi kerusakan (*injury*) atau saat pertumbuhan jaringan normal yang mengendalikan produksi stroma pembuluh darah (angiogenesis). Penelitian klinis telah menduga peran jalur angiogenesis pada pertumbuhan kolorektal yang potensial mematikan. Pengobatan dengan antibodi anti-VEGF *bevacitumab* menambah rata-rata masa hidup keseluruhan selama 4,7 bulan pada kanker kolorektal lanjut (masa hidup dengan standar terapi rata-rata 15.6 bulan) (Hurwitz H et al. 2004). Identifikasi perbedaan molekuler antara kanker untuk pengobatan masih diperdebatkan.

2.2.7. Jalur Stem Sel

Stem sel pada KKR mempunyai bakat berkemampuan untuk memperbaharui diri sendiri. Stem sel tunggal KKR dapat tinggal di tempat yang serba bisa tumbuh seperti jaringan hati dan menghasilkan metastasis. Saat ini belum memungkinkan mengisolasi secara individu stem sel KKR, tetapi protein permukaan sel tertentu (CD133, CD44, CD166, dan *aldehyde dehydrogenase 1*) adalah petanda yang diharapkan sebagai stem sel. Stem sel normal yang terdapat pada kriptas kolon sebagai perekat dan interaksi *epitel-stroma* yang terlarut untuk mempertahankan diferensiasi dan pembelahan sel. Sistem stem sel yang mengontrol pertumbuhan secara teori dapat digunakan untuk pengobatan dan pencegahan kanker (Boman BM and Huang E 2008; O'Brien CA et al. 2007; Ricci-Vitiani L et al. 2007; Dalerba P et al. 2007).

2.3. Jenis KKR Berbasis Genetik dan Molekuler Kolon

Revolusi dalam biologi molekuler telah banyak menambah pengetahuan tentang biologi KKR, terutama proses berbagai stadium karsinogenesis, tetapi KKR masih sering terjadi dan tetap sangat mematikan (130000 kasus baru dan kematian 57000 per tahun di AS). Pengetahuan patogenesis dari kanker seharusnya diaplikasikan dalam deteksi dan pengobatan yang lebih baik untuk memperbaiki kesehatan masyarakat (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002; Fearon ER and Vogelstein B 1990).



Gambar 9. Perubahan genetik berhubungan dengan *Tumorigenesis Kolorektal*.

Mutasi APC mengawali proses neoplasma dan progresi tumor akibat mutasi gen-gen lain. Pada FAP, mutasi APC hereditas akan berkembang sejumlah fokus kriptas aberan displastik (*Aberrant Crypt Foci, ACF*), kemudian berkembang mutasi gen lain. Tumor dari HNPCC berkembang melalui cara yang sama, meskipun seri mutasi tidak identik. Defisiensi MMR mempercepat proses ini. K-RAS adalah onkogen yang hanya membutuhkan satu kejadian genetik untuk aktivasi ini. Gen-gen spesifik lain sebagai gen-gen supresor tumor untuk aktivasinya membutuhkan kejadian dua gen (satu dari masing-masing alel). Kromosom 18q21 dapat berisi beberapa gen-gen supresor tumor yang berbeda terlibat dalam neoplasma kolorektal, bersama gen-gen DCC, DPC4 dan JV18-1 sebagai kandidat. Berbagai ragam perubahan genetik lain masing-masing sebagai fraksi kecil dari KKR lanjut, yang berpengaruh terhadap heterogenitas biologi dengan sifat klinis yang berbeda-beda (Boland CR 1997; Kinzler KW and Vogelstein B 1998).



Gambar 10. Histopatologi *Adenoma Carcinoma Sequence* Kanker Kolorektal (Kinzler KW and Vogelstein B 2002).

Pada Kripta kolon normal, sel epitel tepat berbaris di atas membran basalis dengan bentuk yang seragam di antara kelenjar. Pada lesi hiperplastik tampak morfologi normal, tetapi penambahan jumlah sel pada kripta menyebabkan kepadatan dan lipatan mukosa memberikan gambaran gigi-geraji. Pada morfologi displastik ACF (*Adenoma Crypta Focus*) pada adenoma tampak peningkatan ratio inti/sitoplasma, arsitektur yang kurang seragam, dan banyak inti sel tidak lagi terletak di atas membran basalis.

2.3.1. Kanker Kolorektal Sporadik

Kanker Kolorektal (KKR) sporadik adalah KKR pada individu tanpa riwayat keturunan. Epidemiologi, klinis, patologi, dan kebanyakan studi molekular menunjukkan hampir seluruh KKR sporadik atau hereditas berasal dari polip adenoma. Transformasi dari kolon normal ke adenoma dan karsinoma meliputi serial kompleks yang mengaktifkan gen promosi pertumbuhan tumor serta inaktivasi gen supresor tumor. Terjadinya adenoma dimulai dengan hilangnya fungsi gen supresor tumor APC, diikuti aktivasi onkogen K-ras. Kemudian hilangnya fungsi gen-gen pada kromosom 18q dan inaktivasi p53 yang menghantar menjadi degenerasi ganas. Karsinogenesis kolorektal meliputi dua jalur dasar yaitu instabilitas kromosom dan mikrosatelit. Pada instabilitas kromosom seluruh bagian dari sebuah kromosom kehilangan gen yang spesifik serta jumlah DNA tiap sel (*aneuploidy*). Jalur ini terjadi pada 85% kanker

sporadik dan seluruh kasus kanker pada FAP. Defek DNA akibat sistem MMR (*Mismatch Repair*) menyebabkan fenotip MSI (*Microsatellite Instability*). Jalur ini terjadi pada 15% kanker kolorektal sporadik dan hampir semua kasus HNPCC (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

Instabilitas Kromosom:

Jalur ini khas melibatkan inaktivasi gen supresor akibat mutasi atau delesi alel (LOH: *Loss of Heterozygosity*) sebagai *tumorigenesis*. Hal ini menyebabkan aneuploid dan ekspansi klon progenitor yang bermutasi akibat kehilangan kontrol pertumbuhan sel (*cell growth checkpoints*) yang progresif. Perubahan histologi adenoma tubular menjadi villosa, adenoma menjadi karsinoma, diferensiasi baik menjadi buruk sering bersamaan dengan kejadian LOH. Instabilitas kromosom melibatkan gen APC, gen K-ras, gen DCC (*Deleted in Colon Cancer*), gen p53 (Boland CR 1997).

Gen APC

Berasal dari lengan panjang kromosom 5, dianggap sebagai penjaga pintu masuk ke dalam karsinogenesis kolon, karena gen ini bertanggung jawab terhadap perubahan epitel normal ke awal adenoma, serta molekul yang mengawali KKR sporadik (Kinzler KW and Vogelstein B 1998). Protein APC mempunyai multifungsi sebagai protein supresor tumor, juga berperan dalam proliferasi, diferensiasi, migrasi sel, dan apoptosis. Mutasi APC menyebabkan delesi pada terminal karboksi dari protein yang penting pada supresi tumor. Bagian gen ini terdapat di daerah yang melakukan dimerisasi, sehingga terputusnya (*truncated*) bagian protein ini akan mengganggu fungsi *wild-type* APC (efek negatif dominan). Pada bagian sentralnya protein APC mengikat β *catenin*, yang penting dalam adhesi molekul permukaan sel (*e-cadherin* /CDH1) dan berperan dalam mempertahankan ikatan sel normal. Secara normal, APC membentuk kompleks dengan protein lain (*axin* dan *serine threonine kinase*) dalam ikatan dengan β -*catenin*. Ikatan β -*catenin* mengalami fosforilasi dan pengaturan menurun dalam sitoplasma. Jika protein APC bermutasi menjadi tidak aktif, maka β -*catenin* tidak mengalami regulasi yang menurun tetapi masuk ke dalam nukleus, bersama transkripsi lainnya meningkatkan regulasi gen yang menyebabkan pembentukan adenoma.

Mutasi germinal *misesence* APC telah diketahui pada penderita tanpa FAP dengan awal KKR atau adenoma multipel. H307K pada keluarga Yahudi Ashkenazi dan E1317Q dipercaya memengaruhi karsinogenesis melalui pengaruh negatif yang dominan akibat mutasi daerah gen APC.

Adenoma pada FAP biasanya terjadi setelah mutasi somatik yang didapat dari alel kedua gen APC. Mutasi somatik APC terjadi pada 50% adenoma sporadik (Kinzler KW and Vogelstein B 1998) dan 75% KKR sporadik (Miyaki M et al. 1994; Miyoshi Y et al. 1992; Powell SM et al. 1992). Mutasi APC terjadi pada awal adenoma, prevalensinya tidak bertambah pada stadium lanjut adenoma (Powell SM et al. 1992). Mutasi APC biasanya mengakibatkan pemutusan pucuk kromosom (*truncation*), tetapi pada 15% KKR memproduksi protein *wild-type* (Smith KJ et al. 1993). Peran APC

harus digarisbawahi karena pada KKR banyak terdapat mutasi β *catenin*, suatu mediator *downstream* yang penting pada fungsi APC (Shih IM et al. 2000). Inaktivasi kedua alel APC pada percobaan tikus terjadi sangat awal pada lesi mikroskopis KKR (Levy DB et al. 1994; Luongo C et al 1994). Pada manusia, identifikasi paling awal kriptas displastik, yang disebut fokus kriptas aberan juga menunjukkan perubahan APC (Jen J et al. 1994).

Gen K-ras

Kirsten-ras (K-ras) proto-onkogen mutasi pada 50% KKR. K-ras mengodekan GTP kecil yang terikat protein (p21^{ras}) yang termasuk transduksi sinyal mitogen melalui membran sel. Aktivasi K-ras terjadi pada stadium pertengahan *tumorigenesis* (awal adenoma menjadi *adenoma intermediate*). Aktivasi K-ras mengubah GDP menjadi GTP, awal kaskade yang mengawali berbagai faktor transkripsi seperti *c-myc*. Pokok mutasi K-ras berakibat meningkatnya transduksi sinyal yang terus menerus. Mutasi K-ras hanya terjadi jika sebelumnya terdapat inaktivasi gen APC. Mutasi K-ras menyebabkan polipoid atau pertumbuhan protuberan pada adenoma (Yashiro M et al. 2001). Pada adenoma kecil hanya 9% menunjukkan mutasi K-ras, sedangkan adenoma yang lebih dari 1 cm tampak mutasi pada 58% dan 47% pada kanker kolon (Vogelstein B et al. 1988). Mutasi ras menyebabkan regulasi yang meningkat dari DNA *metiltransferase*, *cyclin D* dan gastrin yang penting pada patogenesis KKR (Aktas H et al. 1997; Guan RJ et al. 1999; Nakata H et al. 1998). Mutasi K-ras juga terjadi pada 92% kriptas hiperplastik (Pronk GJ and Bos JL 1994; Rommel C and Hafen E 1999).

Gen DCC

Gen DCC (*Deleted in Colon Cancer*), yang mengodekan molekul adhesi sel reseptor yang terlibat dalam invasi dan metastasis KKR. DCC juga sebagai substrat apoptosis dan supresor tumor. Kehilangan fungsi DCC, penting pada stadium lanjut *adenoma-carcinoma sequence adenoma intermediate* ke adenoma lanjut. Delesi alel jarang pada adenoma tubular yang kecil (13%), meningkat sampai 73% pada karsinoma (Vogelstein B et al. 1988). Gen supresor tumor lain yang ditemukan dekat dengan lokus DCC terdapat pada kromosom 18q (Fearon ER et al. 1990). Ukuran gen besar yang sulit ditentukan perannya pada KKR, tetapi hilangnya protein DCC berhubungan dengan prognosis buruk (Shibata D et al. 1996).

P53

Hilangnya p53 kritis pada transisi adenoma stadium lanjut kepada awal karsinoma. Delesi kromosom 17p jarang bermanifestasi pada adenoma, tetapi terjadi pada keadaan lanjut *adenoma-carcinoma sequence* (Herman JG et al. 1998). Mutasi p53 teridentifikasi pada 50% displasia berat dan 75% pada KKR (Powell SM et al. 1992). Delesi alel kromosom 17p, lokus gen p53 adalah kehilangan alel yang paling sering pada KKR. Kebanyakan mutasi *wild-type* melalui LOH. Ekspresi *Wild-type* p53

mempunyai efek antikanker dengan memengaruhi penghentian siklus sel G1 untuk memperbaiki DNA atau apoptosis. Protein *wild type* sebagai aktivator transkripsi secara normal didapatkan dalam jumlah yang kecil, tetapi terjadi regulasi yang meningkat (*up regulation*) pada stres sel cedera DNA akibat radiasi, hipoksia, dan mengurangi mutasi genotoksik (Ko LJ and Prives C 1996). Sinyal stres atau onkogen mengaktifkan p53 melalui MDM2, protein regulasi negatif dari p53 (Prives C 1998). P53 juga berperan penting pada adenokarsinoma usus halus sporadik, melalui jalur karsinogenesis yang berbeda dengan KKR (Wheeler JM et al. 2002).

Pada kanker kolon kehilangan fungsi p53 membutuhkan perubahan molekul lain yang dicetuskan oleh mutasi APC, karena pada pasien dengan mutasi garis benih keturunan p53 (Sindroma Li-Fraumeni) tidak menunjukkan poliposis kolon ataupun kecenderungan kanker kolon (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

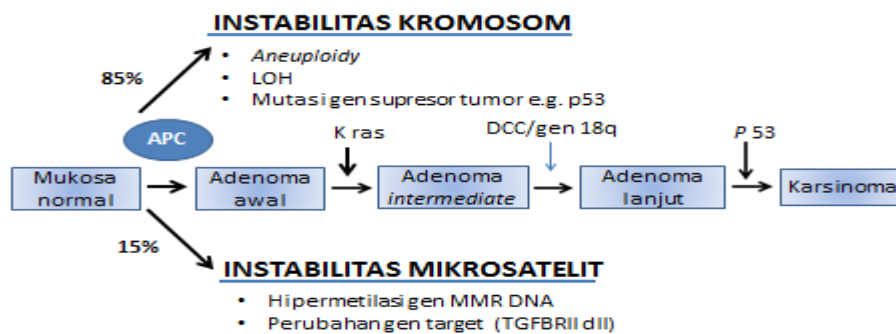
Instabilitas Mikrosatelit: Jalur kedua terbanyak disebut jalur hipermutabilitas melibatkan mutasi enzim yang terlibat langsung dalam proses MMR DNA. Jalur ini merupakan patogenesis predominan pada HNPCC dan 15% pada KKR sporadik. Sindrom ini meliputi mutasi pada enam buah gen diawali huruf "h": hMSH2, hMSH6, hMLH1, hMLH3, hPMS1 dan hPMS2. (Fearon ER and Vogelstein B 1990).

Kerusakan pasangan nukleotida saat replikasi DNA diketahui oleh protein MMR kompleks yang unik. Protein yang dikode oleh hMSH2 mengidentifikasi titik mutasi dan membentuk kompleks dengan protein MMR lain seperti seperti hMSH6 (Kolodner R 1996). Setelah bergabung dengan hMLH1 dan hPMS2, unit ini mengawasi eksisi segmental deretan yang baru disintesis untuk menjamin replikasi yang tepat. Mutasi genetik terakumulasi akibat kesalahan replikasi yang tidak dikoreksi. Disfungsi sistem MMR menyebabkan mutasi fenotipe. Mutasi terjadi saat replikasi mitosis akibat terpelesetnya DNA polimerase pada tempat untai, kemudian bergabung dengan kerusakan pada perbaikan pembacaan heteroduplek (Shibata D et al. 1994). Hasil akhir adalah kesalahan replikasi seperti multiplikasi akibat pengulangan rangkaian *adenine* dan *cytosine* mikrosatelit dalam DNA tumor. Untungnya kebanyakan mikrosatelit terjadi pada daerah gen yang tidak mengode. Sebagian gen seperti tipe II TGF-beta reseptor (TGF β RII), mengulang deretan pengode rentan mutasi dan kehilangan fungsinya.

Instabilitas mikrosatelit meliputi gen TGF- β RII. TGF- β menghambat proliferasi sel yang bekerja pada permukaan sel dengan mengikat TGF- β RII dan menghambat proliferasi tumor. Mutasi TGF- β II pada kebanyakan KKR memperlihatkan MSI,

sehingga diduga mutasi ini berperan pada *tumorogenesis* kolorektal. Sinyal TGF- β RII pada nukleus diperantarai seri protein SMAD, termasuk SMAD4, yang terjadi pada sindrom poliposis juvenile (Chung DC 2000; Heldin CH et al. 1997; Mark P. de Caestecker et al. 2000; Akhurst RJ and Balmain A 1999).

Proses epigenesis MSI terjadi pada 15% KKR sporadik. Hampir seluruh HNPCC mempunyai fenotipe MSI dengan mekanisme berbeda. Pada HNPCC tumor, berasal dari mutasi germinal gen MMR (biasanya hMLH1 dan hMSH2) diikuti kejadian LOH (*Loss of Heterogeneity*) pasangan alel tipe *wild*. Pada KKR sporadik MSI positif, inaktivasi peredaman gen MMR (75% hMLH1) terjadi oleh grup metilen melekat secara kovalen pada daerah gen promotor. Kehilangan ekspresi gen pada hipermetilasi adalah epigenetik karena aktivitas gen yang berubah tanpa perubahan struktur gen (Wu Y et al. 1997; Herman JG et al. 1998; Miyakura Y et al. 2001; Baylin SB et al. 2000; Goel A et al. 2001).



Gambar11. Diagram bagan jalur karsinogenesis kolon. DNA, *Deoxyribonucleic Acid*. LOH, *Loss of Heterozygosity*. TGF, *Transforming Growth Factor* (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

2.3.2. Sindrom Kanker Kolon Herediter

2.3.2.1. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)

Adalah Kanker Kolorektal (KKR) dengan autosomal dominan. Terdapat pada 1-5% dari KKR. HNPCC harus dibedakan dengan sindrom kanker kolon herediter lain seperti FAP dan poliposis juvenilis (Lynch HT and Lynch JF 1994; Warthin AS 1925; Lynch HT et al. 1966; Rodriguez-Bigas MA et al 1997; Samowitz WS et al. 2001).

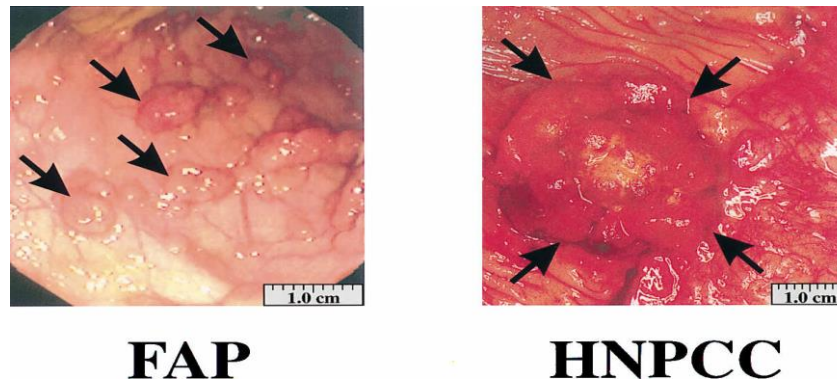
Karakteristik Klinis

Secara klinis polip pada HNPCC cenderung datar, kecil terutama terletak pada bagian kolon proksimal, mengandung fokus displasia berat. Sering berbentuk tumor vilosa dan cenderung mengalami transformasi ganas dibanding adenoma sporadik. Secara P.A.

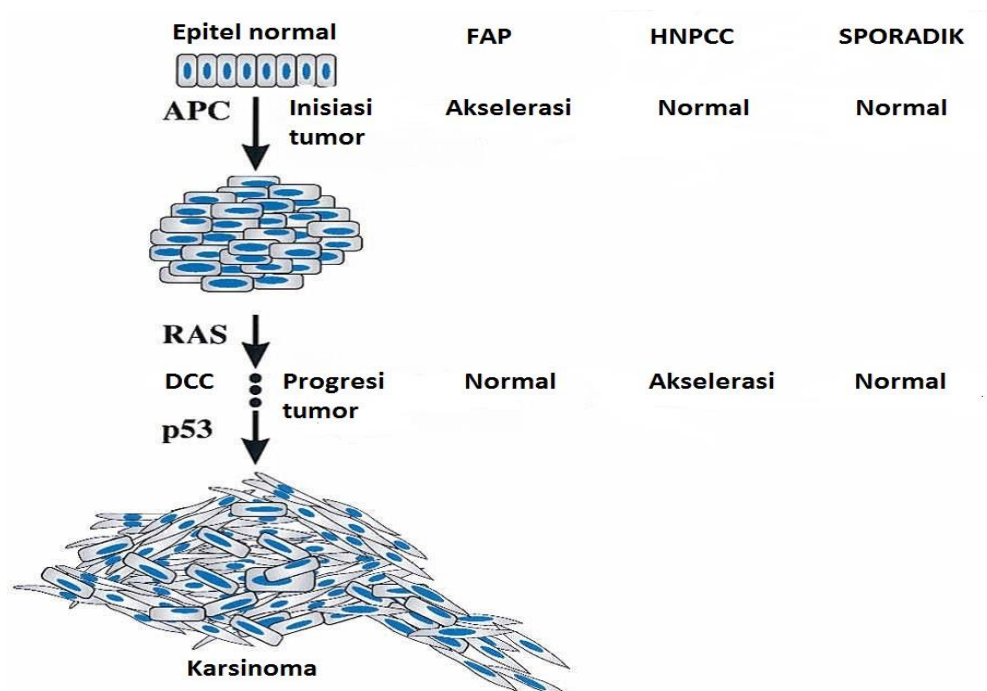
mempunyai gambaran histologi berdiferensiasi buruk dan undiferensiasi (padat dan kribiformis), sebagian besar mempunyai sel *signet-ring* bermucin. Pertumbuhan sel eosinofil besar pada dasarnya tersebar dengan ruang seperti sel kelenjar kecil dengan infiltrasi padat inflamasi terutama Sel T limfosit CD3+. Gambaran nodul mirip penyakit *Crohn*, terdiri dari populasi heterogen dari sel B dan sel T, yang mengelilingi neoplasma. Sesuai dengan kriteria Bethesda, kelainan histopatologi sendiri dapat mendiagnosis HNPCC pada KKR usia di bawah 45 tahun. Lynch dan Kaul, mengemukakan jumlah dan densitas limfosit yang menginfiltrasi tumor pada KKR sebagai skrining tes untuk MSI (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002; Mecklin JP et al 1986; Jass JR 2000).

Individu HNPCC dengan mutasi pada satu dari gen MMR DNA mempunyai risiko > 80% kemungkinan KKR pada usia 75 dibandingkan 5% pada populasi umum (Vasen HF et al 1996). Risiko meningkat 1,6% per tahun dari usia 25 tahun sampai 75 tahun. inaktivasi pengemban protein ini menyebabkan banyaknya mutasi sesuai dengan terpaparnya secara menetap dari karsinogen. HNPCC akibat mutasi pada sel germinal terdapat juga predisposisi kanker di luar kolon. Namun, spektrum kanker ekstrakolon berbeda dengan FAP. Istilah *sindroma Lynch* mempunyai mempunyai dua fenotipe yang berbeda tergantung ada atau tidak neoplasma ekstra kolon. *Lynch* tipe 1 hanya mempunyai risiko tumor kolon lebih awal, sedangkan *Lynch* tipe 2 mempunyai tumor lain di luar kolon, termasuk endometrium, ovarium, gaster, hepatobilier, pankreas, usus halus, ginjal, ureter, dan susunan saraf pusat (Lynch HT et al. 1988; Watson P et al. 1994; Aarnio M et al. 1999; Vasen HF et al. 1996). Mutasi gen MMR yang berbeda menyebabkan perbedaan kanker ekstra kolon (Green SE et al. 1998; Watson P and Lynch HT 1993). Mutasi MSH2 mempunyai risiko kanker lambung, traktus urinarius, dan tumor ovarium (Vasen HF et al 1996). Usia rata-rata KKR pada HNPCC adalah 44 tahun, 30 tahun sebelum kanker pada populasi umum (Jass JR et al. 1994; Jass JR and Stewart SM 1992). Seperti kanker sporadik, keganasan juga berasal dari polip adenoma. Transformasi polip sporadik menjadi kanker rata-rata 8 – 10 tahun, sedangkan pada HNPCC perubahan polip menjadi ganas hanya butuh 2 – 3 tahun, serta lebih sering berhubungan dengan lesi yang serempak (*synchronous* atau *metachronous*) (Lynch HT et al. 1993). Kecepatan terbentuknya adenoma pada HNPCC sama dengan populasi kanker sporadik, tetapi

sekali terbentuk adenoma, perkembangan menjadi karsinoma akan cepat terjadi. Berbeda dengan FAP, ratusan adenoma cepat terbentuk, tetapi kecepatan menjadi karsinoma sama dengan sporadik adenoma. Tidak terdapat petanda yang nyata pada HNPCC mempersulit identifikasi dan penanganan klinis, maka kunci terpenting HNPCC adalah mengetahui secara lengkap dan rinci riwayat keluarga (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).



Gambar 12: Contoh Tumor adenoma jinak kolorektal FAP melalui kolonoskopi dan HNPCC: panel kanker dari reseksi operasi.



Gambar 13. Bagan yang melibatkan proses pembentukan adenoma dan progresi dalam seting KKR sporadik, HNPCC (*Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer*) dan FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*) (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

Kriteria Definisi HNPCC

Kriteria **Amsterdam I** 1990, yaitu setelah disingkirkan adanya FAP, maka: 1. tiga atau lebih anggota keluarga secara histologi dibuktikan KKR, yang salah satunya terdapat hubungan keluarga langsung; 2. KKR mencakup minimal dua generasi; 3. satu atau lebih KKR didiagnosis sebelum usia 50 tahun. Kriteria tersebut terlalu ketat terutama untuk keluarga kecil dan gagal mengenal manifestasi tumor di luar kolon, maka pada tahun 1999 dilakukan revisi **Amsterdam II** yang melibatkan kanker lain yang berhubungan dengan HNPCC, tetapi kriteria ini juga terlampaui sempit sehingga kehilangan 1/3 anak dengan mutasi MMR (Vasen HF et al. 1999; Salovaara R et al. 2000). Kriteria **Bethesda** 1997, melibatkan berbagai kelainan gambaran klinikopatologi HNPCC, lebih terpusat pada individu pasien (daripada seluruh keluarga) serta mengumumkan secara resmi tes MSI. Kriteria Bethesda membutuhkan satu dari hal-hal berikut (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002; Rodriguez-Bigas MA et al. 1997):

1. individu dengan kanker dalam keluarga dengan kriteria Amsterdam;
2. individu dengan dua kanker yang berhubungan dengan HNPCC, termasuk kanker di luar kolon yaitu endometrium, ovarium, gaster, hepatobilier, usus halus, karsinoma sel transisional ginjal atau ureter;
3. individu dengan KKR dan satu keluarga keturunan derajat satu dengan KKR atau adenoma kolorektal; satu dari kanker didiagnosis pada usia kurang dari 45 tahun dan adenoma didiagnosis pada <40 tahun;
4. individu KKR atau kanker endometrium didiagnosis pada usia <45 tahun;
5. individu dengan KKR di usus bagian kanan dengan diferensiasi buruk atau tidak terdiferensiasi (padat atau bentuk kribiformis), didiagnosis pada usia <45 tahun serta terdiri dari baik lembaran-lembaran padat sel-sel eosinofilik besar dan ruangan mirip kelenjar kecil;
6. individu KKR > 50% sel *signet-ring* didiagnosis pada usia <45 tahun;
7. individu dengan KKR yang didiagnosis pada usia <40 tahun.

Revisi Petunjuk Bethesda untuk Tes MSI pada KKR:

1. KKR atau kanker uterus yang didiagnosis pada pasien <usia 50 tahun;
2. terdapat tumor kolorektal *synchronous*, *metachronous* atau tumor yang berhubungan dengan HNPCC tidak tergantung usia (KKR, endometrium, lambung, ovarium, pankreas, ureter, dan pelvis renal, saluran bilier, kelenjar *sebacea*, *keratoacantoma*, pada *sindroma Muir-Torre*, serta kanker usus halus);
3. KKR usia <60 tahun dengan diagnosis MSI-H (perubahan 2 atau lebih dari 5 panel marker mikrosatelit yang direkomendasi National Cancer Institute) dan terdapat kelainan histologi spesifik (limfosit infiltrasi tumor, reaksi limfositik seperti penyakit *Crohn*, diferensiasi musinosa/sel *signet-ring*, atau bentuk pertumbuhan *medullary*);

4. KKR didiagnosis pada satu atau lebih keturunan derajat satu dari tumor yang berhubungan dengan HNPCC, dengan salah satu dari kanker didiagnosis <50 tahun;
5. KKR didiagnosis pada dua atau lebih keturunan derajat satu atau dua dari tumor yang berhubungan dengan HNPCC tidak berkaitan dengan usia.

Tes Genetik HNPCC

Fenotipe MSI dapat dideteksi pada jaringan tumor penderita HNPCC. Konsensus National Cancer Institut di AS menetapkan standar panel *marker* mikrosatelit dan kriteria fenotipe MSI. Dari enam *marker* mikrosatelit, ditetapkan jika minimal tiga *marker* menunjukkan instabilitas, maka tumor dianggap menunjukkan h-MSI (*high level*) (Boland CR et al 1998). 90% HNPCC menunjukkan tingkat h-MSI. Dalam hal ini, dianjurkan untuk segera melakukan tes gen DNA MMR jalur benih pada HNPCC. Yang paling sering adalah hMSH2 dan hMLH1 (Lynch HT et al. 1997). Jika pada spesimen hanya menunjukkan 1 atau 2 *marker* yang tidak stabil maka dianggap suatu MSI-L (l-MSI) dan biasanya dikeluarkan dari tes mutasi gen MMR. Namun, demikian data-data terakhir menunjukkan tumor dengan L-MSI juga dapat sebagai penyebab mutasi MMR (Wu Y et al. 1999). 10-15% KKR sporadik menunjukkan MSI. Penyebab MSI pada kebanyakan tumor ini adalah hipermetilasi pada mutasi garis benih gen MMR (biasanya h-MSI) (Aaltonen LA et al. 1998; Ionov Y et al. 1993; Lothe RA et al. 1993; Thibodeau SN et al. 1993). Sebaliknya 50% pada individu HNPCC dapat diidentifikasi mutasi keturunan garis benih pada gen MMR. Kehilangan bialel pada hipotesis serangan kedua (*two hit Knudson's canonic*) terjadi jika alel kedua dari gen yang bukan berasal dari induk menjadi tidak efektif, sering melalui pokok mutasi (*point mutation*), membentuk perubahan rangka (*frameshift*) atau delesi kromosom (Knudson Jr AG 1977).

Mutasi pokok (*point mutation*) dari enam gen yang terlibat dalam *nukleotida mismatch repair*, MLH1 (kromosom 3p), MSH2 (2p), PMS1 (2q), PMS2 (7p), MSH6 (2) dan akhirnya ini MLH3 (5) telah teridentifikasi pada pasien-pasien HNPCC (Wu Y et al. 2001). Gen tambahan dalam fraksi kecil bermutasi pada 20-70% (Van de Water NS et al 1994). Mutasi hMSH6 ditemukan pada HNPCC bersama Ca Endometrium (Kolodner RD et al. 1999; Wijnen J et al. 1999). Lebih dari 90% mutasi yang terdeteksi adalah MSH2 dan hMLH1 (Liu B et al. 1996; Miyaki M et al. 1997). Mutasi germinal masih terus diteliti, kebanyakan menunjukkan perubahan panjang mutasi serta produksi protein yang terputus *truncated protein* (Mecklin JP et al. 1986; Jass JR 2000; Lynch HT and Kaul 2000).

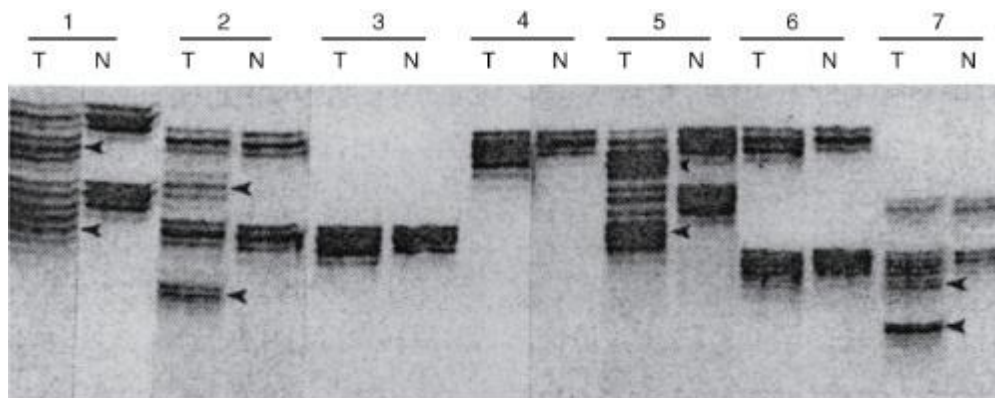
Tes Mikrosatelit Instabilitas pada Jaringan Normal dan Tumor

Pada kasus baris T adalah DNA tumor dan N adalah DNA jaringan normal pada pasien yang sama. *Marker* (D2S123, terletak pada kromosom 2) adalah mikrosatelit yang dibentuk oleh *tandem repeat* dinukleotida CA yang bervariasi dari panjang kromosom. Normalnya panjang pengulangan adalah stabil pada jaringan somatik. Pada contoh di bawah, analisis PCR dilakukan terhadap genomik DNA, alel baru untuk *marker* tampak pada tumor 1,2,5, dan 7. Karena pada jaringan tumor terdapat *defek MMR*,

maka pada kelainan klonal tampak pengulangan kopi CA yang meningkat, kemudian terjadi kesalahan fungsi gen, yang mengakibatkan fenotipe ganas (Science 1993; 260:812).

Pengulangan sekuens DNA direferensikan sebagai *microsatellite* dengan variasi panjang pada masing-masing manusia. Pada mutasi gen MMR terdapat akumulasi kesalahan sekuens DNA yang menjadi lebih panjang atau lebih pendek yang disebut instabilitas mikrosatelit atau MSI.

MMR bertugas memperbaiki kesalahan *spelling* saat proses pembelahan sel. Jika terjadi mutasi serta akumulasi kesalahan pasangan proto-onkogen dan tumor supresor gen akan menyebabkan pertumbuhan tumor yang tidak terkontrol. Kedua kopi gen MMR harus berubah sebelum terjadi kanker.



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

PCR digunakan juga untuk tes genetik kelainan DNA dan RNA. Standar PCR adalah teknik untuk deteksi dan amplifikasi sekuens DNA dan RNA melalui serial proses denaturasi, *annealing*, dan elongasi. Berbagai macam PCR yang dapat digunakan. *Real Time* PCR (RT-PCR) adalah teknik yang digunakan untuk monitor progres PCR pada waktu yang sama. RT-PCR dikenal juga sebagai *quantitative PCR* (qPCR). Jumlah produk PCR (DNA, cDNA, RNA) yang relatif sedikit dapat dihitung secara kuantitatif. Pemeriksaannya dapat melalui pewarnaan yang berikatan pada *double-stranded* DNA atau menggunakan probe spesifik sekuens (*sequence specific prob*). RT-PCR memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi. RT-PCR diperlukan karena RNA kurang stabil dibandingkan DNA. Kuantitas mRNA dalam sel merupakan parameter jumlah gen yang terekspresi. Analisis hasil RT-PCR dapat dilakukan secara *absolute quantification* dan *relative quantification*. Gen referensi yang digunakan adalah *housekeeping gene*. Perbedaan RT-PCR dan PCR biasa adalah deteksi produk PCR yang dapat dihasilkan sejak fase awal reaksi, sedangkan PCR biasa hanya

menggunakan elektroforesis gel untuk deteksi produk amplifikasi pada fase akhir, tanpa mengetahui jumlah produk PCR yang diekspresi (Hatta et al; 2017). Tes genetik dapat langsung dilakukan terhadap gen MSH2, MLH1, MSH6 pada keluarga dengan riwayat anamnesis jelas atau tes jaringan tumor terhadap MSI.

Mutasi salah satu dari keenam gen MSI meningkatkan 70-82% risiko KKR, 60% kanker endometrium, 12% kanker ovarium dan sisanya kanker lambung, usus halus, liver, saluran bilier, otak, ureter, dan pelvis ginjal.

90% HNPCC menunjukkan MSI dan 15-20% pada KKR sporadik. Sebagian pasien yang bukan klasik HNPCC tidak menunjukkan MSI tetapi mutasi pada MSH6, juga tidak semua HNPCC menunjukkan mutasi MMR.

Pada HNPCC mutasi pertama diturunkan dari ayah atau ibu yang disebut mutasi germinal. Mutasi kedua yang didapat umumnya tidak diketahui, mungkin akibat terpapar lingkungan kimia, fisik, biologi atau kesalahan replikasi DNA. Tergantung dari letak mutasi kedua, tumor dapat tumbuh di kolon, ovarium dan lain-lain.

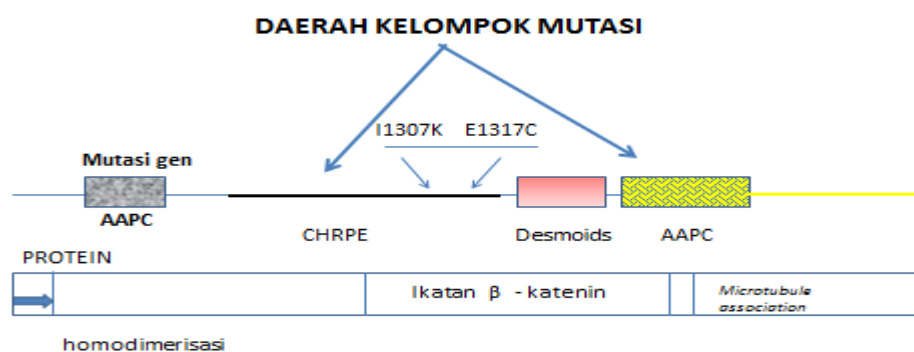
Sebagian individu yang mempunyai mutasi germinal herediter MMR tidak mendapatkan kanker karena tidak terdapat mutasi kedua yang mengganggu fungsi gen, tetapi mempunyai kemungkinan 50/50 mutasi pada generasi berikutnya. Gen MMR pada HNPCC bukan terletak pada kromosom seks, oleh karena itu mutasi ini dapat diturunkan dari pihak ayah maupun ibu.

2.3.2.2. FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*)

FAP merupakan kasus terbanyak sindrom poliposis herediter, dengan beratus-ratus sampai beribu-ribu adenoma kolorektal pada usia muda. Hal ini menunjukkan autosomal dominan yang herediter dengan penetrasi sampai 80-100%. Prevalensinya diduga 1/5000 - 1/10.000. Tanpa kolektomi KKR FAP terjadi 10-15 tahun setelah permulaan poliposis (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002). Gen yang bertanggung jawab pada FAP telah dikloning oleh dua kelompok peneliti tahun 1999. Gen APC adalah gen besar dengan lebih dari 1400 mutasi yang telah dilaporkan. satu alel APC yang bermutasi diwariskan sebagai mutasi garis germinal (*germline mutation*), dan adenoma terjadi ketika alel kedua dari orang tua yang tidak terkena mengalami mutasi menjadi tidak aktif. Mutasi germinal akan memprediksi serangan yang didapat

kemudian. Mutasi antara kodon 1194 – 1392 sangat menyokong adanya kehilangan alel APC somatik yang menyebabkan KKR. Mutasi germinal pada daerah tertentu jika berpasangan dengan serangan kedua cenderung menyebabkan mutasi terputusnya gen. 20% kasus FAP mempunyai riwayat keluarga negatif dan menunjukkan mutasi baru pada lokus APC (Grodan J, et al. 1991; Kinzler KW et al. 1991; Nishisho I et al. 1991; Soussi T 2002; Lamlum H et al. 1999; Bussey H 1975; Rubinfeld B et al. 1993; Su LK et al. 1993; Frayling IM et al. 1998; Laken SJ et al 1997).

Gen supresor APC terletak pada kromosom 5q21. Gen APC mempunyai 15 exons dan mengkode 2843 asam amino yang bekerja pada jalur sinyal Wnt. Mutasi gen APC didapatkan pada 80-90% pasien FAP klasik dan 10-30 % AFAP. Telah dilaporkan mutasi 300 gen APC yang berbeda. Kebanyakan adalah *frameshifts* akibat insersi, delesi, atau mutasi *nonsense* yang mendahului *truncated* protein APC. Lokasi mutasi pada gen APC berhubungan dengan beratnya polyposis dan risiko kanker. Telah dilaporkan hubungan genotipe dan fenotipe. Mutasi gen APC di bagian sentral pada Codon 160 -1393 menyebabkan FAP klasik. Mutasi antara kodon 1250 - 1464 menyebabkan polyposis yang banyak. Terdapat variabilitas fenotipe intra dan *interfamily*. AFAP dapat mirip FAP, MAP, atau bahkan KKR sporadik. Tes *genetic* berguna untuk diagnosis (Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello M 2000)



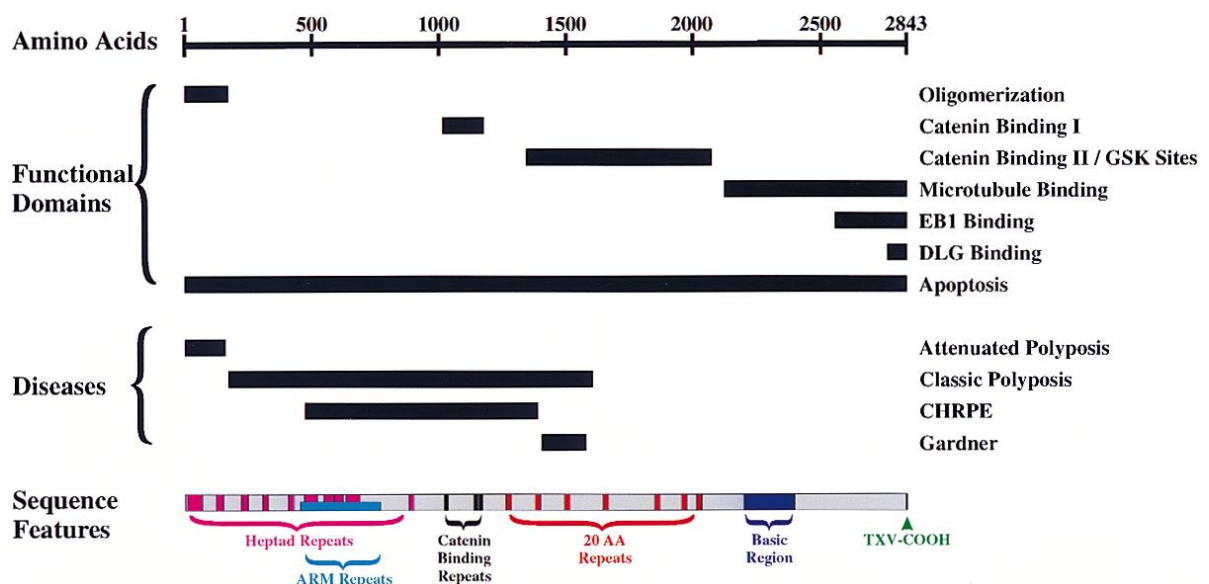
Gambar 14. Wewenang fungsi protein APC yang berhubungan dengan mutasi genetik menunjukkan gambaran fenotipe tertentu. AAPC, *attenuated adenomatous polyposis coli*. CHRPE, *Congenital Hypertrophy of Retinal Pigmented Epithelium* (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

Tabel i. Mutasi APC pada Neoplasma KKR

FAP	Adenoma Sporadik	Kanker Sporadik
-----	------------------	-----------------

Insidensi populasi	1 dalam 7000	1 dalam 2	1 dalam 20
Prevalensi mutasi APC	> 85% ^b .	> 80% ^c .	> 80% ^d
	(Mutasi Germinal)	(Mutasi Somatik)	(Mutasi Somatik)
Sifat dari mutasi ^a			
<i>Truncating</i>	96% ^e	89% ^f	98% ^g
<i>Missense</i>	4% ^e	11% ^f	2% ^g

- Berdasarkan mutasi APC yang mungkin tepatnya didefinisikan pada tingkat nukleotida. Yang dimaksud dalam tabel ini, mutasi *frameshift*, *nonsense*, and *splice site* dianggap “*truncating*”.
- Berdasarkan pada 62 anak-anak (Powell et al., 1993).
- Berdasarkan pada analisis 12 polip kolorektal (Jen et al., 1994).
- Berdasarkan pada analisis 23 *cell line* kolorektal kanker (Smith et al., 1993).
- Berdasarkan 174 mutasi (Nagase and Nakamura, 1993).
- Berdasarkan 19 mutasi (Miyoshi et al., 1992; Powell et al., 1992).
- Berdasarkan 56 mutasi (Miyoshi et al., 1992; Powell et al., 1992).

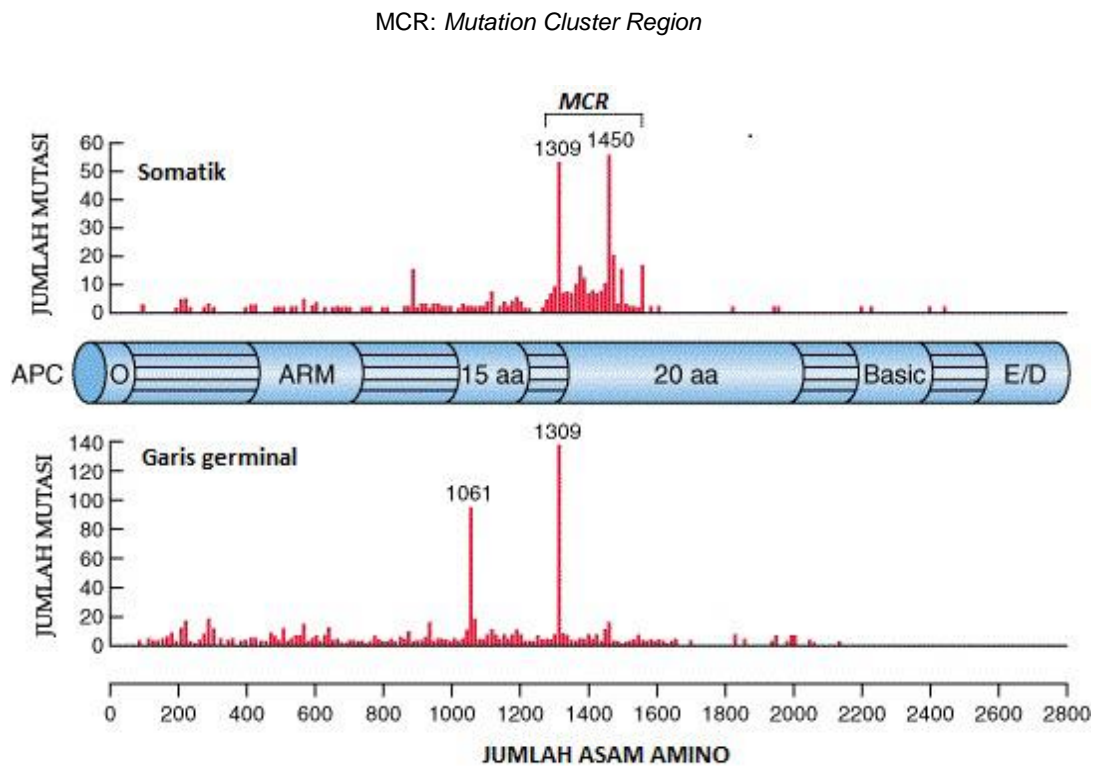


Gambar 15a. Fungsional dan Properti patogenik dari APC (Kinzler KW and Volgenstein B 1998).

Mutasi Germinal dan Somatik Gen Supresor Tumor APC

APC mengodekan sebuah protein dengan 2843 asam amino dengan enam domain utama: *regio oligomerisasi* (O), *armadillo repeats* (ARM), *15-amino-acid repeats* (15 AA), *20-amino-acid repeats* (20AA), sebuah *basic region*, dan sebuah domain termasuk ikatan EB1 dan homolog besar *Drosophila Disc* (E/D). Di sini ditunjukkan posisi di dalam gen APC dari total 650 mutasi somatik dan 826 mutasi germinal (*data base APC* <http://p53.free.fr>). Kebanyakan mutasi ini menyebabkan terputusnya (*truncation*)

protein APC. Mutasi geminal ditemukan relatif tersebar sampai kodon 1600 kecuali pada 2 mutasi *hotspot* asam amino 1061 dan 1309, yang bersama-sama terdapat pada 1/3 mutasi yang ditemukan pada keluarga FAP. Mutasi somatik pada tumor kolon ditemukan pada sebuah daerah gen yang dikenal sebagai MCR (*mutation cluster region*). Lokasi MCR pada domain 20 asam amino berperan penting pada supresi tumor. Kehilangan fungsi kedua alel APC pada tumor FAP sering terjadi melalui LOH.



Sumber : Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition

Gambar 15 b. *Mutation Cluster Region Gen APC* (Fauci AS et al, 2016).

Manifestasi Klinis FAP

Pasien FAP biasanya asimtomatik sampai pubertas ketika polip kolon mulai terjadi. Rata-rata awal polip terjadi pada usia 25 tahun dengan gejala perdarahan rektum, anemia. Perubahan kebiasaan buang air besar terjadi 8 tahun kemudian. 90% FAP terdiagnosis pada usia 48 tahun (Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM. 2007). Interval terbentuknya adenoma, diagnosis kanker serta kematian adalah 3 tahun. 82% karier gen FAP mempunyai polip pada sigmoidoskopi di usia 15 tahun (Petersen GM, Slack J et al. 1991). Poliposis pada usia dewasa berawal dari sejumlah polip kecil, berlanjut menjadi banyak sampai seluruh kolon terbentuk seperti karpet adenoma. Secara histologi polip identik dengan polip sporadik, dapat tubular, tubulovilosa atau glandular

vilosa. Jumlah secara makroskopik pada kolektomi rata-rata 1000 buah, tetapi dapat juga puluhan atau ribuan, kebanyakan kurang dari 1 cm. Risiko KKR adalah masalah pokok pada polip (Debinski HS et al. 1996). Pada 25% FAP tidak terdapat riwayat keluarga (Bussey H 1975). Gambaran histologi mukosa yang secara makroskopis normal menunjukkan sejumlah adenoma mikroskopik, yang terkecil adalah kriptas kolon tunggal (kriptas aberan) atau sekelompok kriptas displastik (fokus kriptas aberan) (Naylor EW and Lebenthal E 1980). Fokus kriptas aberan dapat dideteksi dengan endoskop *magnifying* dan merupakan perubahan awal karsinogenesis KKR familial maupun sporadik (Jang YS et al. 1997).

Kanker kolorektal akibat FAP bisa terjadi pada usia 9 tahun. Kanker mempunyai distribusi yang sama dengan populasi umum. Kanker yang terjadi serempak (*synchronous*) terdapat pada 48%. Meskipun dilakukan program skrining, 25% pasien FAP didapatkan kanker pada waktu kolektomi (Jang YS et al. 1997).



Gambar 16. Potongan Operasi Colon dengan Poliposis.

iPartian reseksi kolon pasien FAP. Tampak poliposis yang mengandung protein APC yang tidak berfungsi penuh (Jass JR et al. 1994).

Polip dan Kanker Gastrointestinal Bagian Atas

Mutasi germinal APC terjadi pada semua sel somatik. Tumor sering juga terjadi di luar kolon seperti *neoplasma tiroid*, bilier, hati, serta adrenal (Johnson JP 1991; LeSher AR et al 1989; Plail RO et al. 1987; Walsh N et al. 1987). Polip gaster dan usus halus terjadi hampir pada semua pasien FAP. Kebanyakan polip kelenjar fundus adalah nonneoplastik, tetapi perubahan menjadi displastik harus diperhatikan karena mutasi gen APC. Adenoma pada antrum terdapat pada 5% FAP (Walsh N et al. 1987). Polip pada duodenum mempunyai risiko lebih besar menjadi adenokarsinoma karena polip duodenum selalu berupa adenoma. Adenokarsinoma duodenum merupakan penyebab utama kematian setelah kolektomi profilaktik dan didapatkan pada 4–12% sepanjang kehidupannya. Adenoma cenderung berkelompok pada ampulla Vateri, yang terjadi antara 60-90% pasien FAP dan hampir secara universal terjadi pada usia tua (Bjork J et al. 2001; Debinski HS et al. 1995). Skrining dan pengamatan dengan esofagogastroskopi dianjurkan setiap 1-3 tahun. Jejunal dan ileal adenoma terdapat pada 40% dan 20% pasien FAP, tetapi perubahan menjadi ganas pada daerah ini jarang terjadi.

Kelainan di Luar Usus

Sindrom Gardner merupakan penyakit hereditas mutasi gen APC. Terdiri dari poliposis gastrointestinal, osteoma jinak mandibula dan tulang panjang, dan kista epidermoid kulit (Bulow S et al. 1984; Utsunomiya J and Nakamura T 1975). >90% *Sindrom Gardner*, mengalami lesi pigmentasi asimtomatik fundus mata (*Congenital Hypertrophy Retinal Pigment Epithelium/ CHRPE*), biasanya bilateral dan multipel (Blair NP and Trempe CLK 1980; Burn J et al. 1991; Traboulsi EI et al. 1987). Komplikasi lain yang fatal pada sindrom poliposis adenomatosa adalah *fibromatosa mesenterium difusa* atau tumor desmoid, yang terjadi pada 1/3 pasien dan biasanya menyebabkan kematian karena obstruksi intestinal atau oklusi vaskuler (Gurbuz AK et al. 1994; Jones IT et al 1986). Tumor ini jarang radiosensitif (Kiel KD and Suit HD 1984). Dilaporkan keberhasilan kemoterapi dengan sitotoksik (Lynch HT et al. 1994) dan NSAID *sulindac* (Tsukada K and Church JM 1991). *Celecoxib* dan terapi hormonal tamoxifen dan progesteron dilaporkan dapat mengurangi dan mengecilkan adenoma pada FAP. Pada sebagian pasien NSAID, dapat menghambat ekspresi COX2 yang berlebihan pada FAP (Belliveau P and Graham AM 1984; Klein WA et al. 1987; Kinzbrunner B et al. 1983; Lanari A 1983).

Korelasi genotipe dan fenotipe pada FAP tidak dapat dipastikan, karena mutasi APC dapat bermanifestasi intra atau ekstra kolon pada keluarga yang berlainan (Giardiello FM et al. 2000), bahkan pada keluarga yang sama dan kembar identik (Stevenson JK and Reid BJ 1986). Sebagian keluarga mengalami FAP tanpa mutasi gen APC. Pengaruh genetik dan lingkungan epigenetik bertanggung jawab terhadap variasi fenotipenya (Houlston R et al. 2001). Mutasi genetik antara kodon 1250 – 1464 terutama sekitar kodon 1300 menyebabkan poliposis difus. Mutasi pada lebih ke ujung proksimal (5') dan distal (3') menyebabkan pelemahan FAP dengan sedikit polip usus (Nagase H et al. 1992).

Operasi pada FAP adalah satu-satunya pilihan terapi, dengan melakukan total proktokolektomi dengan ileostomi atau ileo-anal anastomosis. Risiko kanker rektum setelah kolorektal anastomosis lebih tinggi pada pasien dengan mutasi APC antara kodon 1250 dan 1464 (Bertario L et al 2000).

Obat-obatan dosis tinggi Vit C sebagai antioksidan yang diberikan pada pasien subtotal kolektomi dilaporkan dapat mengurangi jumlah polip rektum. Diet kalsium, Vit E atau suplemen serat gandum dapat dicoba (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

Tes genetik pada individu yang berisiko dianjurkan pada usia 10-12 tahun. Anak yang positif harus dilakukan skrining sigmoidoskopi, sedangkan yang negatif dianjurkan sigmoidoskopi pada usia 20 tahun (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

2.3.2.3. Varian *Sindrom Poliposis Familial*

Sindrom Glioma-poliposis Turcot adalah sindrom poliposis kolon familial dengan tumor primer sistem saraf sentral (Baughman Jr FA et al. 1969). Spektrum fenotipenya luas, dari satu sampai ribuan adenoma kolon serta tumor otak dengan berbagai bentuk histopatologi. Belum diketahui apakah hal ini merupakan mutasi autosomal dominan. Umumnya mutasi germinal gen APC meduloblastoma mendahului poliposis. Risiko meduloblastoma adalah 92 kali dari pada populasi umumnya. CHRPE telah

didapatkan pada sindrom ini. Karena penyakit ini merupakan kelompok hereditas, maka kolonoskopi dan *imaging* otak pada anak-anaknya perlu dilakukan (Hamilton SR et al. 1995; Munden PM et al. 1991).

Attenuated APC (AAPC)

AAPC berupa adenoma yang lebih sedikit dengan bentuk datar dari pada polipoid serta terletak lebih di kolon proksimal (Leppert M et al. 1990). Keadaan ini harus dibedakan dengan HNPCC (Lynch HT et al. 1995). Penyakit ini sebelumnya dikenal dengan *hereditary flat adenoma syndrome*, akibat mutasi germinal dari bagian sangat proksimal dan bagian distal gen APC (Spirio L et al. 1993). Laporan akhir-akhir ini disebut sebagai suatu mutasi APC E1317Q pada individu dengan adenoma multipel tanpa poliposis adenoma yang kompleks (Houlston R et al. 2001). Seperti pada FAP klasik, pasien AAPC juga mempunyai kecenderungan multipel polip pada kelenjar fundus, adenoma gaster dan duodenum, lebih jarang terdapat karsinoma periampula. KKR terjadi pada usia lebih tua (rata-rata 55 tahun) dibandingkan FAP klasik (Lynch HT et al. 1993).

Sindrom Poliposis Hamartomatosis

Beberapa sindrom polip hereditas termasuk *Peutz-Jeghers Syndrome* (PJS), *Juvenile Poliposis Syndrome* (JPS) ditandai adanya polip hamartoma multipel pada GIT. Hamartoma adalah kelainan nodul berisi campuran elemen jaringan normal, jarang menunjukkan displasia. Terdapat mutasi germinal gen STK11-LKB1 pada PJS, sedangkan pada JPS terdapat mutasi PTEN dan SMAD4. Sindroma ini berhubungan dengan risiko variabel dari KKR (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002).

Pada PJS selain GI poliposis juga terdapat pigmentasi mukokutan, tampaknya merupakan gen tunggal yang pleiotropik dan autosomal dominan dengan berbagai variasi penetrasi yang tidak komplis (Burdick D and Prior JT.1982; Foley TR et al. 1988). Sindrom ini kebanyakan akibat terputusnya (*truncated*) gen STK11-LKB1 pada mutasi germinal gen *serine-threonine* kinase kromosom 19p, tetapi terdapat juga *problem* heterogenesis genetik (Hemminki A et al. 1998; Jenne DE et al. 1998). Karsinoma esofagus sampai kolon telah dilaporkan pada pasien PJS. Metaanalisis menunjukkan adanya peningkatan risiko kanker pankreas, paru, payudara, ovarium, dan uterus. Hilangnya ekspresi STK11-LKB1 terdapat pada polip epitelium tanpa displasia, sehingga gen ini dianggap sebagai pintu masuk kedalam karsinogenesis sehubungan dengan peran keturunan gen APC pada FAP (Markie D et al. 1996). Kadang-kadang terdapat mutasi dari K-ras dan ekspresi berlebihan dari p53 sebagai jalur adenoma-hamartoma yang sama dengan jalur tradisional adenoma-karsinoma (Entius MM et al. 2001; Gruber SB et al. 1998; Entius MM et al. 1999).

Pada JPS mempunyai morfologi khusus, biasanya soliter, hamartoma pada rektum dari anak-anak, kadang-kadang pada dewasa, tetapi dapat juga berupa poliposis multipel. 30% kasus ini berupa kelompok familial autosomal dominan (Robbin DH and Itzkowitz SH 2002). Mutasi baru tanpa riwayat keluarga juga telah dilaporkan (Beacham CH et al. 1978). Definisi JPS adalah satu dari kriteria berikut: 10 atau lebih polip juvenil kolon, polip juvenil pada seluruh traktus GI, atau berapa pun jumlah polip

dengan riwayat juvenile poliposis pada keluarga (Grosky HW et al. 1982; Sachatello CR et al. 1970; Watanabe A et al. 1979). Perubahan klon genetik pada hamartoma JPS terdapat pada stroma bukan pada sel epitel, sehingga diduga perubahan molekul yang bertanggung jawab pada JPS berasal dari *stroma subepitel* (Fletcher JA et al 1992; Jacoby RF et al. 1997). Sebaliknya displasia polip pada FAP atau PJS adalah pada epitel. Terdapat potensial keganasan pada hamartoma yang jinak akibat defek dasarnya (Kinzler KW and Vogelstein B 1998). Seperti pada kolitis ulseratif, meningkatnya kemungkinan menjadi kanker pada JPS akibat kelainan lingkungan stroma. Disini epitelium yang banyak polip menimbulkan radang kronis, regenerasi yang kemudian berkesempatan mengalami mutasi somatik.

Sejumlah anak JPS mempunyai mutasi germinal gen SMAD4 (dikenal sebagai DPC4 dan MADH4), gen supresor tumor yang terletak pada 18q21, berperan pada sinyal kaskade TGF- β (Houlston R et al. 1998; Howe JR et al. 1998; Huang SC et al 2000; Jacoby RF et al. 1997; Kim IJ et al. 2000). Terdapat juga heterogenitas genetik. Mutasi SMAD4 memperantarai respons hambatan pertumbuhan dan apoptosis (Schutte M et al. 1996). Analisa imunohistokimia polip JPS melibatkan p53 dan p21 sebagai gen supresor tumor mendukung rangkaian kejadian hamartoma-adenoma. K-ras dan p53 telah dilaporkan juga pada polip JPS (Wu TT et al. 1999).

2.4. Kompleksitas Mutasi Genetik pada Kanker Kolorektal

2.4.1. Kompleksitas Gen APC

Meskipun telah terdeteksi berbagai perubahan dan mutasi genetik pada berbagai jenis KKR secara spesifik, tetapi pada kenyataannya terdapat berbagai variasi serta perubahan genetik yang heterogen. Inaktivasi germinal gen APC telah diketahui dengan baik pada sindroma FAP yang terdapat pada lebih kurang 5-10% KKR. Mutasi somatik juga telah diketahui sangat sering pada KKR sporadik, dengan mekanisme utama inaktivasi gen APC akibat hipermetilasi promotor (Kamory E, et al. 2008).

Pada penelitian *hot spot* mutasi beberapa gen APC pada kanker sporadik terdapat pada kodon 1.554, sedangkan pada FAP didapatkan pada kodon 1.194 -1.392. Hampir seluruh mutasi KKR sporadik merupakan tumor dengan kesalahan replikasi positif (*Replication Error/RER+*), yang kemudian ditambah mutasi β -*catenin* atau lokus lain. Dari data yang ada, mendukung teori saling ketergantungan pada “dua serangan” pada APC KKR sporadik seperti pada FAP. Mutasi APC pada daerah dekat kodon 1300 berhubungan dengan kehilangan alel, sementara tumor di luar daerah ini cenderung mempunyai mutasi “patahan” (*truncating*). Mutasi APC juga terjadi sebelum ada perubahan gen MMR (Rowan AJ et al. 2000). Kehilangan heterogenitas (LOH) pada lokus APC adalah kejadian mutasi yang predominan pada KKR. Mutasi gen pada KKR sporadik menunjukkan spektrum yang luas perubahan APC, terdapat heterogenitas serta perubahan berbagai jalur genetik pada KKR. Mutasi APC dapat terjadi melalui garis germinal autosomal dominan pada FAP atau somatik pada sporadik. Perbedaannya pada FAP terjadi satu tahap lebih dulu oleh mutasi germinal, sedangkan pada sekelompok KKR sporadik pada kenyataannya diakibatkan *low penetrance polimorfisme* APC dalam geminal seperti I1307K dan E1317Q (Bougatef K et al. 2008). Seberapa banyak penyakit familial yang tersembunyi ini belum diketahui.

FAP merupakan model yang sudah ditetapkan sebagai jalur perubahan APC diikuti mutasi K-ras serta tumor supresor gen DCC, TP53 dll. LOH akibat inaktivasi kopi kedua heterogenositas berhubungan dengan kromosom aneuploidi dan juga kanker diploid pada mikrosatelit DNA stabil. Instabilitas kromosom pada jalur supresor diawali mutasi APC sedangkan jalur alternatif lain kemungkinan lebih kecil.

2.4.2a. Kompleksitas Gen HNPCC. Sejak 1993 telah ditunjukkan bahwa HNPCC disebabkan mutasi germinal pada gen *mismatch repair*. Dua buah gen yang paling berpengaruh adalah hMSH2 dan hMLH1. Lebih jarang adalah hMSH6 dan hPMS2. Biomarker defisiensi *DNA repair* adalah mutasi *frameshift* panjang yang terbukti pada kesalahan replikasi (RERs) sebagai fenotipe “mutator” yang saat ini dikenal sebagai MSI (*Microsatellite Instability*). Pada KKR hanya sebagian kecil MSI yang berhubungan dengan HNPCC, kebanyakan adalah KKR sporadik. MSI bekerja memengaruhi promosi pada jalur klasik. Mutasi *frameshift* pengulangan yang pendek sering terjadi pada mutasi somatik defek *DNA repair*. Contoh lain TGF β RII bermutasi sebagai promosi dari KKR non-MSI+. KKR sporadik MSI+ menunjukkan profil genetik yang berbeda dari MSS (*Microsatellite Stabil*) dalam kaitannya dengan usia tua, lebih banyak pada wanita, cenderung pada kolon proksimal, berbagai ragam bentuk dan kurang berpotensi metastasis, respon lebih baik terhadap kemoterapi, secara mikroskopis terdapat sedikit perbedaan termasuk berdiferensiasi buruk, diferensiasi musinosa dan infiltrasi limfosit. MSI terbagi dari dua, yaitu: MSI-L, instabilitas pada < 30-40% *marker* dan level tinggi pada MSI-H. *Bandshifts* pada MSI-H terjadi dalam frekuensi yang tinggi (80%) pada *marker* BAT25, BAT26, BAT 34, dan BAT40. Pada MSI-L instabilitas terbatas pada dinukleotida dan pengulangan yang lebih panjang. KKR MSI-L menunjukkan profil yang mirip MSS. MSI-L KKR terutama terdapat pada kolon kiri, kurang agresif seperti juga MSS. Pada penelitian status MSI-H, ditentukan jika ditemukan pada 2 *marker* dari 8 *marker* yang diteliti. Perubahan genetik yang sering adalah mutasi K-ras, TP53, LOH dari 5q, 17p, dan 18q. Mekanisme status MSI-L adalah metilasi dan peredaman gen *DNA repair* 0-6 metilguanin *DNA metiltransferase* (MGMT), di sini terjadi gangguan pembersihan pro-mutagenik metilguanin yang sangat besar pada sistem *mismatch repair* yang utuh. Sulitnya membedakan familial dan sporadik MSI-H merupakan hal penting pada KKR (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007).

2.4.2b. Menentukan HNPCC

Bertahun-tahun perbedaan HNPCC dengan KKR herediter FAP adalah: tidak terdeteksinya adenoma sebelumnya, berhubungan neoplasma ekstra kolon (uterus, lambung, ovarium, usus kecil, pelviureter, otak dan kulit). *Sindroma Lynch* sebagai penamaan baru dari HNPCC dengan kriteria Amsterdam. Keluarga dengan MSI-H menunjukkan gambaran sindrom ini. Pada beberapa kasus keluarga yang memenuhi kriteria Amsterdam, tetapi bukan MSI-H awal KKR dapat terjadi pada usia tua, kurang keberagaman kanker, tidak terdapat predileksi pada kolon proksimal, lebih banyak adenoma dan kurangnya gambaran histologi MSI-H (diferensiasi buruk, diferensiasi musinosa, dan infiltrasi limfosit) (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007).

Semula diperkirakan bahwa dasar keturunan didasarkan pada semua KKR MSI-H, tetapi ternyata kebanyakan KKR MSH-H adalah sporadik dan HNPCC hanya didapatkan sekitar 2-15% saja dari KKR. Demikian pula kasus sporadik yang terdapat mutasi germinal dikelompokkan secara salah sebagai sporadik murni akibat peredaman somatik gen MMR. Minimal 90% KKR MSH-H adalah sporadik (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007).

2.4.3. Menentukan KKR Sporadik atau KKR MSI-H Non-familial

Gold standar KKR sporadik MSI-H adalah tidak terdapatnya mutasi germinal MMR DNA. Namun, secara teknik membuktikan hal tersebut adalah sulit. Bukti yang mendukung hanya tidak adanya riwayat keluarga KKR dan terjadi pada usia tua. Kebanyakan MSI-H KKR sporadik terjadi akibat metilasi dan peredaman MMR DNA hMLH1, tetapi hal ini tidak spesifik, yang ternyata terjadi juga pada HNPCC dan KKR non-MSI-H. Hilangnya ekspresi imunohistokomia hMSH2, hMSH6 atau hPMS2 adalah bukti kuat mutasi germinal pada gen tersebut. Para ahli mendokumentasikan sporadik MSI-H yang bermakna adalah kurang atau tidak adanya mutasi APC, K-ras, dan TP53 serta LOH pada 5q, 17p, dan 18q. Sebagai ganti mutasi ditunjukkan pada TGFbetaRII, IGF2R, BAX, MSH3, MSH6, caspase5, E2F04, Tcf-4, BCL-10, cdx-2, axin, dan hRAD. Kebanyakan KKR sporadik MSI-H menunjukkan fenotipe metilasi pulau CpG (CIMP) dengan hipermetilasi yang luas pada DNA (Markowitz S et al. 1995; Grady WM et al. 1999).

Dalam katagori KKR MSI-H, HNPCC, dan kasus sporadik dipandang sebagai familial dan non-familial dengan proses patologi yang sama (analoginya FAP dan sporadik MSS). Saat ini terbukti bahwa HNPCC dan sporadik MSI-H berbeda pada gambaran demografik, histogenesis, profil molekuler, dan morfologi mikroskopis (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007).

Terdapat keadaan di mana banyak seri mutasi HNPCC mirip KKR MSI-H. Pertama kebanyakan kasus KKR adalah kanker sporadik MSI-H dan mutasi gen KKR terjadi pada dekade lanjut. Situasi kedua HNPCC pada daerah dengan prevalensi KKR yang rendah dan mutasi germinal gen MMR DNA kurang penetran menyebabkan HNPCC muncul pada usia lebih tua dan bisa kasus tunggal pada keluarga (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007).

Secara praktis MSI-H diasumsikan berasal dari HNPCC kecuali dibuktikan lain. Hal yang sama dapat menerangkan frekuensi mutasi yang tinggi pada APC yang tidak tampak pada KKR sporadik MSI-H.

Di Jepang profil patologi dan molekuler pada KKR sporadik MSI-H lebih konsisten dengan HNPCC dari pada kanker sporadik MSI-H asli. Contoh yang spesifik adalah relatif kurang diferensiasi musinosa dan terdapatnya mutasi APC dan TP53. Telah diduga bahwa polip hiperplastik besar pada kolon proksimal merupakan prekursor kanker sporadik MSH-H, dengan faktor risiko gender wanita, BMI yang tinggi dan merokok, sedangkan merokok dan kegemukan bukan gambaran wanita usia tua di Jepang. Hal ini dianggap sebagai kanker sporadik MSI-H melalui jalur terpisah adenoma yang datar pada sporadik MSI-H. Hal ini sesuai dengan frekuensi yang

rendah dari mutasi K-ras dan mutasi yang tinggi pada APC dan TP53 pada kanker MSI-H sporadik di Jepang.

Bukti kuat yang mendukung teori adenoma karsinoma sekuens secara tradisional pada **HNPCC** (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007):

1. terdapat adenoma pada subjek muda dengan HNPCC;
2. adanya kanker awal pada adenoma (polip malignan);
3. adanya sisa adenoma yang berdekatan dengan kanker yang lanjut;
4. adanya MSI dan hilangnya ekspresi gen MMR sama dengan mutasi germinal pada adenoma;
5. pencegahan kanker dengan mengangkat adenoma.

Perbedaan adenoma karsinoma sekuens HNPCC dengan paradigma tradisional adalah konversi derajat tinggi ke karsinoma dalam waktu yang relatif singkat. Hal ini dibuktikan dengan skrining reguler kolonoskopi dengan terdapat perbandingan adenoma-karsinoma yang rendah pada KKR tradisional, seringnya ditemukan displasia derajat berat, dan atau perubahan ke vilosa. Instabilitas DNA pada HNPCC sejak awal merupakan dasar dari perubahan yang cepat. Perubahan morfologi paling awal HNPCC adalah fokus kriptaberan yang secara mikroskopis berupa hiperplasia atau displasia. MSI terjadi pada fokus hiperplasia kriptaberan, polip hiperplastik, polip campuran, dan adenoma *serrated*. Komponen adenoma pada polip campuran dapat berupa adenoma tradisional atau adenoma *serrated* atau keduanya.

Meskipun lebih banyak kasus sporadik MSI dari pada HNPCC, tetapi adenoma sporadik yang menunjukkan MSI-H sangat jarang. Kebanyakan adenoma sporadik yang menunjukkan perkembangan MSI-H adalah kasus HNPCC yang tidak terduga. Hal ini dapat diterangkan karena keterlambatan menetapkan MSI-H yang menyebabkan perubahan cepat dari adenoma ke karsinoma. Pada kanker sporadik MSI-H jarang terjadi perubahan genetik yang ditemukan pada stadium adenoma (yang melibatkan APC, K-ras, dan TP53).

Hal yang mendukung **KKR sporadik MSI-H** murni pada polip *serrated* adalah sebagai berikut (Jass JR et al. 2002; Dionigi G et al. 2007):

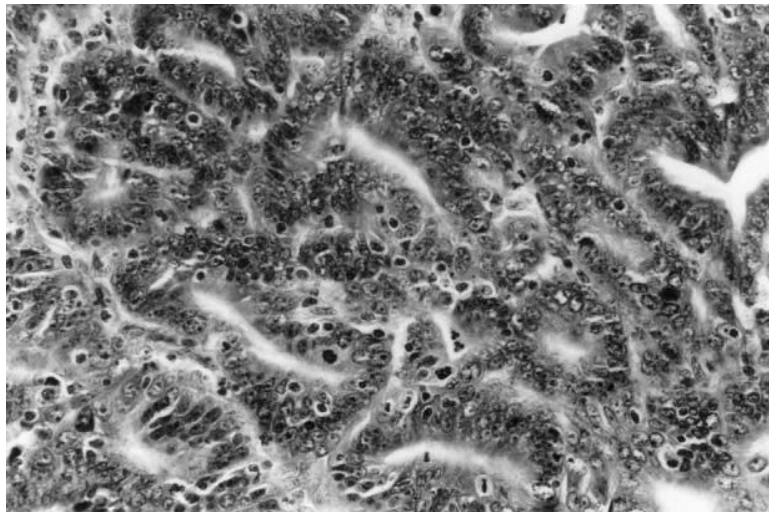
1. menunjukkan MSI-H dan hilangnya ekspresi hMHL1 imunohistokimia pada polip *serrated*;
2. menunjukkan mutasi TGF- β RII, IGF2R, BAX, MSH3, dan MSH6 pada polip *serrated*;
3. ekspresi mucin gaster MUC5AC pada *serrated* KKR sporadik MSI-H;
4. menunjukkan hubungan yang erat antara polip *serrated* dan KKR MSI-H
5. adanya presentasi yang berlebihan KKR MSI-H pada subjek poliposis hiperplastik;

6. menunjukkan arsitektur *serrated* pada KKR MSH-H.

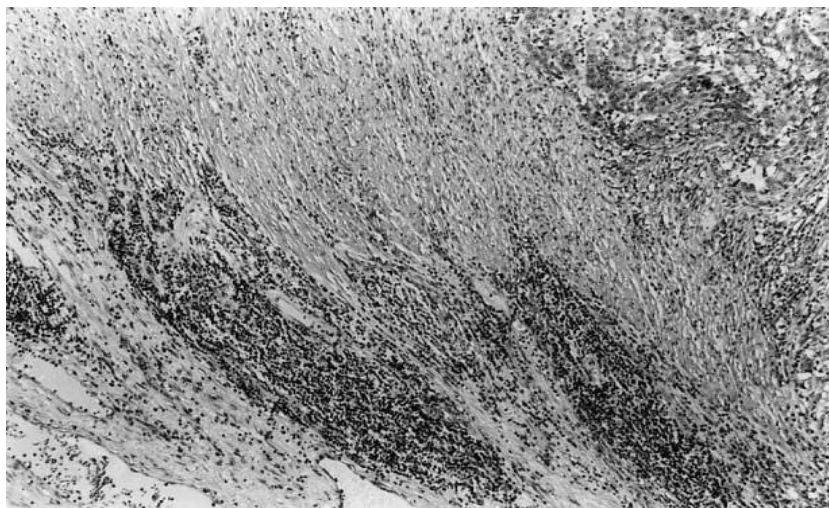
2.4.4. Profil Molekul, Demografi KKR Familial dan Non-Familial

Terdapat perbedaan molekul pada kedua jalur KKR yang berbeda. Pada HNPCC dengan garis sel MSI-H menunjukkan bukti gangguan pada jalur sinyal Wnt seperti mutasi APC dan mutasi *beta-catenin*. Pada KKR sporadik MSI-H menunjukkan bukti yang sedikit akan mutasi APC dan mutasi *beta-catenin*. Kebanyakan menunjukkan reduksi mutasi K-ras pada KKR sporadik MSI-H, mutasi K-ras juga banyak terjadi pada HNPCC. Hal ini sesuai dengan teori adanya perbedaan jalur morfogenesis pada familial dan sporadik MSI-H, terutama jalur adenoma karsinoma sekuens dan rute alternatif (*serrated*). Pada HNPCC mutasi germinal ditemukan pada 40% keluarga dengan kriteria modifikasi Amsterdam minimal ditemukan dua neoplasma pada satu keluarga (KKR atau adenoma/karsinoma endometrial) dan adanya ekspresi MSI-H MMR DNA (hMLH1 dan hMSH2). Pada kasus sporadik, tidak ditemukan riwayat keluarga KKR, usia lebih tua (rata-rata 74 tahun) dan menunjukkan kehilangan ekspresi imunohistokimia hMLH1. Tidak terdapat mutasi germinal dan menunjukkan metilasi hMLH1 (Markowitz S et al. 1995; Grady WM et al. 1999; Shitoh K et al. 2000; Miyaki M et al. 1999).

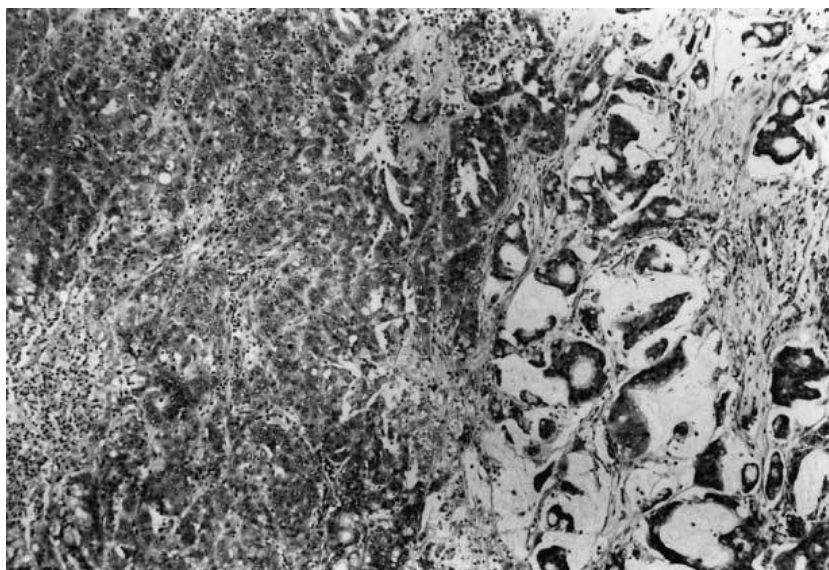
HNPCC menunjukkan kecenderungan pada pria dan terletak pada kolon proksimal, tetapi 40% terjadi pada kolon sebelah kiri dan rektum. Berbeda pada KKR sporadik, MSI-H 90% terdapat pada kolon proksimal dan kebanyakan pada wanita dan perokok. Wanita lebih cenderung menunjukkan metilasi pada hMLH1 sebagai mekanisme inti pembentukan KKR sporadik MSI-H. HNPCC terjadi pada usia muda, sementara KKR sporadik MSI-H lebih tua dari pada KKR MSS atau MSI-L (Aaltonen LA et al. 1993). Secara umum HNPCC mirip KKR tradisional selain frekuensi yang lebih tinggi adanya infiltrasi limfosit (gambar 17). Gambaran ini merupakan gambaran kelompok KKR familial maupun non-familial. Gambaran seperti reaksi *Crohn* (gambar 18) dan peritumoral limfosi secara bermakna lebih sering pada HNPCC. Pada KKR MSI-H sporadik lebih menunjukkan dua atau lebih subklon, dasarnya dibedakan pada derajat diferensiasi, diferensiasi sedang dan buruk, musinosa atau non-musinosa. Area musinosa lebih mirip diferensiasi buruk. Sebaliknya perubahan musinosa pada HNPCC biasanya mempunyai gambaran epitel kolumnar berdiferensiasi baik sampai epitelium dari adenoma vilosa. Daerah yang menunjukkan fokus *sereted* yang jelas terjadi pada KKR MSI-H sporadik. Adenoma *sereted* terjadi pada sporadik MSI-H sedangkan adenoma tradisional pada HNPCC (Jass JR et al. 2002; Aaltonen LA et al. 1993).



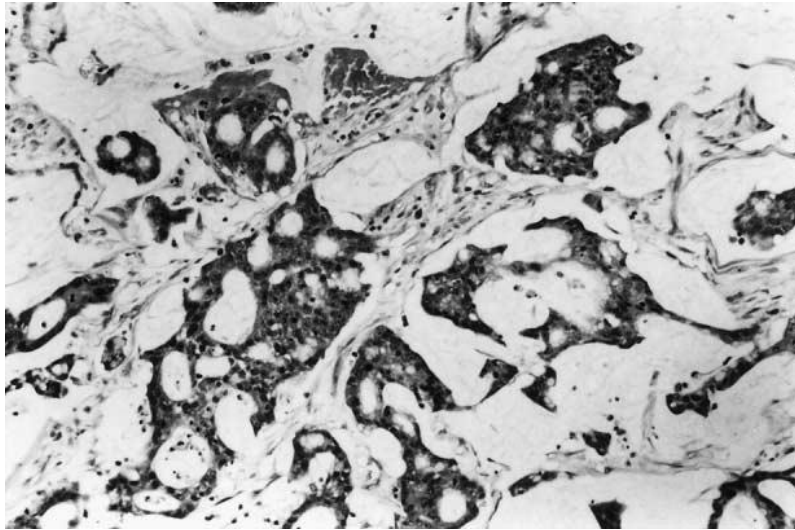
Gambar 17. Limfosit infiltrasi tumor pada KKR berdiferensiasi sedang pasien HNPCC (Dionigi G et al. 2007).



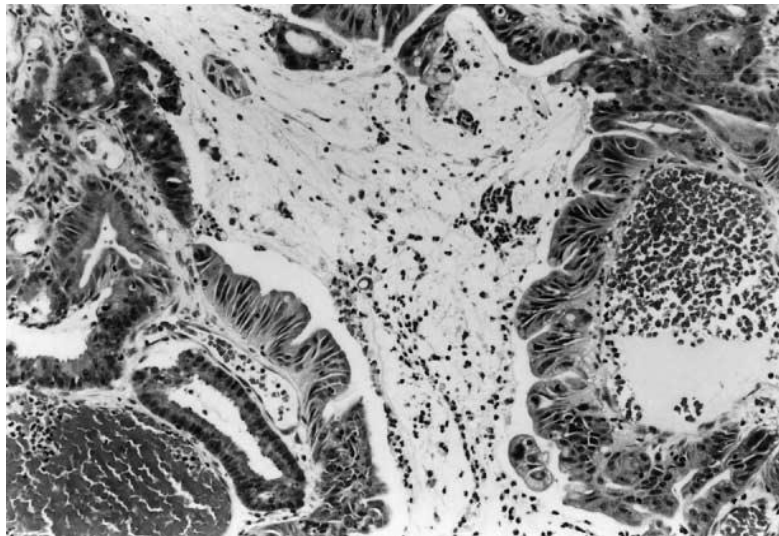
Gambar 18. Reaksi mirip Crohn (nodule limfosit B dengan dikelilingi limfosit T). Pewarnaan HE (Dionigi G et al. 2007).



Gambar 19. KKR Sporadik MSI-H berdiferensiasi buruk yang berdampingan dengan subklon musinos (Dionigi G et al. 2007).



Gambar 20. Adenokarsinoma musinosa berdiferensiasi sedang sampai buruk. Epitelium disusun dalam kelompok dan rantai yang tidak teratur (sama dengan kasus di atas (HE) (Dionigi G et al. 2007).



Gambar 21: Sisa arsitektur *serrated* pada KKR sporadik MSI-H. (HE) (Dionigi G et al. 2007).



Gambar 22. Adenoma *serrated* berlanjut dengan KKR sporadik MSI-H (Dionigi G et al. 2007).

2.5. Petanda Prediksi Kanker Kolorektal

Pengetahuan yang banyak tentang genomik kanker kolorektal akhir-akhir ini merupakan tantangan untuk digunakan dalam klinis (Tabel 1). Sebagian kecil petanda genomik digunakan untuk prediksi mutasi garis benih gen supresor tumor seperti APC, MLH1, dan MSH2 sebagai petanda risiko KKR dan petunjuk angka kejadian serta rekomendasi untuk operasi. Petanda somatik lain belum baku dipakai sebagai nilai prediksi dalam klinis. KKR sporadik dengan defisiensi *mismatch repair* secara keseluruhan mempunyai nilai prognosis yang baik (Samowitz WS et al. 2001; Kim GP et al. 2007; Watanabe T et al. 2001; Ribic CM et al. 2003; Ogino S et al. 2009; Bertagnolli MM et al. 2009).

2.5.1. Deteksi Molekul Noninvasif

Diagnostik molekular menggunakan genetik untuk deteksi awal KKR penting secara klinis, seperti mendeteksi mutasi spesifik dan metilasi DNA aberan pada DNA feses penderita KKR atau adenoma lanjut. Pemeriksaan ini mempunyai sensitifitas 46-77% pada awal KKR yang lebih sensitif daripada *occult blood faeces*, tetapi keunggulan ini belum ditunjukkan dalam mencegah kematian dari kanker (Chen WD et al. 2005; Imperiale TF et al. 2004; Itzkowitz SH et al. 2007). Test DNA feses telah ditambahkan dalam petunjuk skrining KKR oleh Asosiasi Kanker Amerika (Itzkowitz S et al. 2008; Ahlquist DA et al. 2008; Levin B et al. 2008) dan tampaknya sama sensitifnya untuk mendeteksi adenoma stadium lanjut (Li M et al. 2009). Masih dikembangkan pemeriksaan untuk mendeteksi sel plasma bebas DNA (*plasma cell-free DNA*) secara klinis dan profil DNA sebagai target penelitian. Pertanyaan yang juga penting adalah interval yang optimal antara tes serial, pelaksanaan, dan efektivitas biaya pada tes DNA feses dibandingkan imunokimia *occult blood fecal* (Hundt S et al. 2009).

2.5.2. Pengaruh Genetik pada Populasi yang Rentan Mengalami KKR

Epidemiologi genetik pada penderita kembar menunjukkan bahwa 35-100% KKR dan adenoma terjadi pada keturunan penyakit ini (Lichtenstein P et al. 2000; Hemminki K and Mutanen P 2001; Cannon-Albright L et al. 1988). Sindroma seperti HNPCC dapat terjadi pada sebagian keluarga tanpa bukti kelainan *mismatch-repair* (Lindor NM et al. 2005). Beberapa lokus yang mengandung gen yang sangat kuat menyerang (*highly penetrant*) telah diidentifikasi (Wiesner GL et al. 2003; Papaemmanuil E et al. 2008; Neklason DW et al. 2008), tetapi penyebab mutasi tetap belum diketahui. GWAS (*Genomewide Association Studies*) meneliti kemungkinan hubungan ini, tetapi terdapat keterbatasan karena risiko relatif dengan varian-variannya rendah (Zanke BW et al. 2007; Tomlinson I et al. 2007; Broderick P et al. 2007; Tomlinson IP et al. 2008; Tenesa A et al. 2008; Houlston RS et al. 2008).

2.5.3. Tes Genetik untuk Menentukan Predisposisi Genetik

Tes genetik adalah pemeriksaan bahan genetik individu dengan adanya perubahan gen yang menunjukkan berkembangnya penyakit atau meningkatnya risiko penyakit di kemudian hari seperti kanker. Tes genetik dapat dilakukan pada sampel darah, rambut, kulit, cairan amnion atau jaringan lain seperti mukosa mulut. Pemeriksaan ini dilakukan terhadap perubahan kromosom DNA atau ekspresi proteinnya.

Mutasi herediter atau mutasi germinal didapatkan pada semua sel tubuh termasuk sel reproduksi atau sel benih sperma laki-laki dan sel telur pada wanita. Oleh karena itu, mutasi herediter dapat diturunkan dan tes genetik bertujuan melihat ada atau tidak mutasi gen ini pada keturunan.

Pada kanker berbagai tahapan proses merubah sel normal menjadi kanker. Berbagai gen berbeda berperan pada proses ini. Onkogen mempromosikan pertumbuhan sel, jika terjadi mutasi dan ekspresi berlebihan akan menyebabkan kanker. Gen supresor tumor jika bekerja dengan baik akan mencegah pertumbuhan sel di luar kontrol. Gen supresor tumor yang mutasi akan menyebabkan sel tumbuh di luar kontrol dan menjadi kanker. Kanker juga dapat terjadi pada kesalahan gen perbaikan DNA (*DNA repair genes*). Gen ini memperbaiki kesalahan umum pada kopi DNA proses normal. Namun, jika gen ini tidak dapat memperbaikinya, kesalahan ini akan menumpuk dan menyebabkan kanker.

Identifikasi mutasi gen yang spesifik berperan penting dalam mendeteksi alel spesifik pada seseorang, sehingga dimungkinkan melakukan identifikasi individu berisiko tinggi untuk menderita kanker. Sejak diterbitkan pernyataan American Society of Clinical Oncology (ASCO) tahun 1996, tes genetik merupakan bagian dari penatalaksanaan kanker yang diterima secara luas.

Germline testing untuk predisposisi kanker herediter dipakai sebagai bagian dari perawatan pasien yang diduga mengandung risiko yang diwariskan untuk kanker payudara, kolon, lambung, uterus, tiroid, dan kanker primer lain. *Germline testing* dilakukan analisa DNA dari darah atau saliva untuk mendeteksi mutasi gen spesifik yang berkaitan dengan kanker pada seorang individu atau keluarga yang meminta pemeriksaan, sedangkan *somatic genetic profiling* jaringan kanker digunakan untuk memprediksi prognosis dan respons terapi. Terdapat berbagai jenis mutasi yaitu: *high*

penetrance, mutasi yang terdeteksi berakibat perubahan fungsi produk gen yang bersangkutan berisiko tinggi untuk menderita kanker dan *intermediate penetrance*, jenis mutasi dengan risiko sedang untuk menderita kanker. Kedua mutasi ini tidak sering dijumpai. Sebagian besar suseptibilitas kanker justru muncul dari sejumlah varian dalam sekuens DNA gen tertentu (SNP's, *Single Nucleotide Polymorphism*) yang suseptibilitas kanker dikenal sebagai *low penetrance variant* (LPVs). LPVs masing-masing secara tersendiri menunjukkan risiko kanker terbatas, tetapi jika bergabung akan menyebabkan risiko tinggi pada mereka dengan riwayat keluarga yang kuat. Hingga sekarang telah diketahui 100 jenis SNP yang diasosiasikan dengan kanker. Risiko relatif yang didapat dengan tes ini diterjemahkan ke dalam risiko absolut dengan berbagai jenis algoritme, meskipun belum ada metode standar untuk itu, serta diperlukan evaluasi sebelum dinyatakan sah untuk penggunaan klinik (Robson ME et al. 2010; Kresno SB 2011).

Jenis-jenis tes genetik: tes genetik prenatal, tes genetik simtomatik, tes genetik karier, tes genetik presimtomatik.

Diagnostik *testing*: digunakan untuk diagnosis atau menyingkirkan genetik spesifik berdasarkan gejala dan mutasi fisik. Hasil tes memengaruhi pilihan pengobatan.

Tes karier: dilakukan untuk mengidentifikasi yang membawa satu kopi mutasi gen, yang jika diikuti dua kopi menyebabkan kelainan genetik. Tes ini dilakukan pada individu dengan riwayat keluarga dengan kelainan genetik dan pada etnik tertentu dengan risiko yang meningkat pada genetik spesifik. Jika kedua orang tuanya dilakukan tes, hal ini akan memberikan informasi risiko anak dengan kondisi genetik.

Tes prenatal: dilakukan untuk mendeteksi perubahan pada gen atau kromosom fetus sebelum lahir. Hal ini dilakukan pada pasangan dengan risiko mempunyai bayi dengan kelainan gen tertentu, membantu keputusan untuk *abortus medikamentosa*. Pemeriksaan ini tidak dapat mendeteksi seluruh kemungkinan kelainan herediter.

Diagnosis genetik preimplantasi: dilakukan pada embrio manusia sebelum implantasi sebagai bagian dari prosedur *fertilisasi in vitro*.

Tes prediktif dan presimtomatik: mendeteksi mutasi gen berhubungan dengan kelainan yang timbul sesudah lahir atau di kemudian hari. Tes ini dilakukan pada riwayat keluarga kelainan genetik, tetapi belum ada kelainan saat tes. Seperti BRCA1 mempunyai risiko kumulatif 65% risiko kanker payudara.

Tes forensik: tes untuk menentukan individu dengan maksud hukum, identifikasi bukti kriminal positif atau negatif, atau tes hubungan keluarga paternitas.

Tes parental: tes genetik keturunan yang sama antara individu. Hal ini berdasarkan bukti $\frac{1}{2}$ DNA dari ayah dan $\frac{1}{2}$ DNA dari ibu. Menentukan sekuens DNA yang menggambarkan kesimpulan hubungan.

Tes penelitian: bertujuan menemukan gen yang belum diketahui, mempelajari bagaimana gen bekerja dan pengetahuan kondisi genetik. Tes ini tidak dilakukan pada pasien atau penjamin kesehatan.

Farmakogenomik: bertujuan menentukan pengaruh genetik terhadap respons obat.

Kategori Hasil Tes

Tes positif: menunjukkan mutasi genetik yang berhubungan dengan meningkatnya risiko menderita kanker. *True negatif test*: individu tes negatif dengan keluarga juga tes mutasi negatif. Risiko menderita kanker sama dengan populasi umum. *Indeterminate*: orang pertama dalam satu keluarga dengan tes negatif. Tes ini akan sangat kompleks karena metode tes mungkin kurang sensitif atau mutasi dari sebagian gen yang sulit dianalisis, belum diketahui atau sangat jarang. Juga mutasi pada gen tunggal kanker. Tes yang tidak informatif dapat terjadi karena setiap orang mempunyai variasi natural yang umum pada DNA yang disebut polimorfisme atau penyakit yang menyebabkan mutasi. Pada kasus-kasus tertentu tes pada anggota keluarga yang terkena dan tidak terkena dapat menjelaskan hasil ini.

Tes genetik mempunyai makna yang penting bagi mereka yang hasilnya positif maupun negatif. Bagi yang negatif, anggota keluarga penderita FAP atau HNPCC membebaskan mereka dari kolonoskopi periodik, walaupun hasil tes tidak menjamin 100% yang bersangkutan tidak menderita kanker di kemudian hari. Bagi yang hasilnya positif maknanya akan lebih jelas dengan tindak lanjut seperti mencegah kontaminasi lingkungan yang berisiko kanker. Tes genetik pre-simtomatik menyangkut pemberian informasi yang tepat tentang tes dan interpretasinya baik kepada keluarga yang meminta tes maupun keluarganya. Kesulitan menyangkut tersebarnya keluarga baik dalam hal tempat maupun waktu, juga masalah kerahasiaan, asuransi, dan kesempatan kerja yang berbeda dari satu negara dengan negara lainnya. Dari segi laboratorium belum semua mutasi gen yang menunjukkan predisposisi kanker tertentu dapat diidentifikasi dengan tes DNA, selain juga diperlukan mekanisme *quality assurance* (Robson ME et al. 2010; Kresno SB 2011).

Tabel ii. Pola Instabilitas Genomik pada KKR (Markowitz, Bertagnoli. 2009)⁷⁸

Tipe Instabilitas dan Sindrom	Jenis Defek	Gen yang Terlibat	Fenotipe
Instabilitas kromosom: <i>LOH pada berbagai lokus</i>	Somatik	<i>LOH</i> pada: APC, TP53, SMAD4	Karakteristik dari 80-85% KKR sporadik, tergantung stadium.
Defek MMR DNA: HNPCC	Garis-Germinal	MLH1, MSH2, MSH6 (mutasi gen garis-germinal)	Berbagai KKR primer, akselerasi progresi tumor, meningkatnya risiko tumor endometrium, gaster, dan urotelial.
KKR Sporadik dengan defisiensi MMR	Somatik	MLH1 metilasi somatik	KKR dengan peningkatan risiko diferensiasi buruk, lebih sering pada kolon sebelah kanan, secara klinis kurang agresif daripada tumor tanpa diferensiasi MMR.
Fenotipe metilator <i>CpG island</i> -Lokus target metilasi	Somatik	Target lokus MLH1, MINT1, MINT2, MINT3	Sifat dari 15% KKR, dengan kebanyakan menunjukkan defisiensi MMR dari

Defek perbaikan eksisi basa- Poliposis yang berhubungan dengan MYH	Garis- Germinal	MYH	kehilangan ekspresi MLH1 tumor.
			Perkembangan dari 15 atau lebih adenoma kolorektal dengan meningkatnya risiko KKR.

LOH: *Loss of Heterozygosity*

KKR: Karsinoma Kolorektal

MYH: *mutY homologue*

Tabel iii. Gen-gen Supresor Tumor dan Onkogen yang Umum Berhubungan dengan KKR⁷⁸

Gen yang Terpengaruh	Frekuensi %	Sifat Defek	Keterangan
APC	85	Aktivasi dari sinyal Wnt akibat ketidakmampuan mendegradasi onkoprotein β -catenin	Mutasi garis-germinal pada adenoma poliposis familial; inaktivasi somatik ditemukan pada 85% KKR sporadik.
MLH1, MSH2, MSH6	15-25	Defek MMR <i>singel-nukleotida</i> DNA memungkinkan akumulasi dari mutasi onkogenik dan hilangnya supresor tumor	Mutasi garis-germinal pada KKR nonpoliposis herediter; peredaman epigenetik menyebabkan hilangnya ekspresi protein MLH1 tumor.
TP53	35-55	Mengodekan sebuah protein yang bertanggung jawab untuk regulasi siklus sel; menonaktifkan mutasi <i>missense</i> bersama dengan LOH pada 17p	Mutasi garis-germinal pada sindrom <i>Li-Fraumeni</i> .
TGFBR2	25-30	Reseptor yang bertanggung jawab untuk jalur sinyal mediasi penghentian pertumbuhan dan apoptosis; tidak aktif oleh mutasi pergeseran kerangka pengulangan polyA dalam urutan pengodean TGFBR2 pada pasien dengan defek MMR atau dengan menonaktifkan mutasi dari daerah kinase	Mutasi tampak pada >90% tumor dengan instabilitas mikro satelit dan 15% pada karsinoma kolon mikrosatelit yang stabil.
SMAD4	10-35	Komponen penting dalam transformasi jalur sinyal faktor pertumbuhan β , bersama dengan protein yang terkait SMAD2 dan SMAD3; SMAD4 dan SMAD2 berlokasi di kromosom 18q, tempat yang sering kehilangan heterozigositas pada karsinoma kolorektal; tidak aktif oleh delesi atau mutasi homozigot	Mutasi garis-germinal pada <i>Familial Juvenile Polyposis</i> , dengan risiko KKR sebesar 60% pada usia lebih dari tiga sampai empat dekade.
KRAS	35-45	Pengodean KRAS G-protein, dengan aktivasi konstitutif menghasilkan aktivasi dari jalur sinyal PI3K-PDK1-PKB dan RAF-MEK-ERK1/2, sehingga meningkatkan kelangsungan hidup sel dan supresi apoptosis	Mutasi garis-germinal pada sindrom <i>cardiofaciocutaneous</i> .
BRAF V600E	8-12	Mengaktifkan mutasi di BRAF <i>serine-threonine kinase</i> (sebuah mediator penurunan sinyal melalui jalur RAF-MEK-ERK1/2, yang meniru konsekuensi biologis dari mutasi KRAS	Berhubungan dengan poliposis hiperplastik, dengan peningkatan kejadian adenoma bergerigi, seperti KRAS, mutasi garis-germinal pada sindrom <i>cardiofaciocutaneous</i> .

PTEN	10-15	Peningkatan aktivasi dari jalur sinyal PI3K melalui kehilangan fungsi dengan cara menginaktivasi mutasi, mengakibatkan pesinyalan kelangsungan hidup sel dan supresi apoptosis	Mutasi garis-germinal pada sindrom Cowden), yang membawa risiko tinggi untuk karsinoma payudara, dengan peningkatan risiko 10% untuk KKR; kemungkinan berperan dalam memelihara stabilitas kromosom.
-------------	-------	--	--

LOH: *Loss of Heterozygosity*
 KKR: Karsinoma Kolorektal
 ERK : *Extracellular Signal-regulated Kinase*
 MAPK : *Mitogen-activated Protein Kinase*
 MEK : *MAPK Kinase*
 PDK1 : *Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isozyme 1*
 PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase*
 PKB : *Protein Kinase B*

Tabel iv. Prognostik dan Prediktif Marker DNA pada Kanker Kolorektal⁷⁸

Marker DNA	Keterangan
Prognostik	
APC	Sebuah mutasi garis-germinal menunjukkan sindrom predisposisi KKR, adenoma poliposis familial, dengan 80-100% risiko KKR seumur hidup. Pasien dengan mutasi garis-germinal APC menjalani profilaksis kolektomi atau proktokolektomi.
MLH1, MSH2, MSH6	Sebuah mutasi garis-germinal pada gen-gen ini, dan yang jarang terjadi, pada gen MMR yang lain menunjukkan KKR nonpoliposis herediter, dengan 40-80% risiko KKR seumur hidup, dan juga peningkatan risiko kanker endometrium. Pasien dengan mutasi garis-germinal gen MMR menjalani surveilans kolonoskopi berkala dan dapat dipertimbangkan untuk profilaksis kolektomi dan histerektomi.
MLH1 penahanan metilasi-terkait	Inaktivasi somatik dari MLH1 pada KKR primer dibuktikan baik oleh deteksi instabilitas DNA mikrosatelit atau kehilangan ekspresi protein MLH1 tumor pada analisis imunohistokimia, dan lebih sering pada KKR stadium awal daripada penyakit lanjut. Inaktivasi seperti ini dapat menjadi petunjuk dari penyakit yang lebih lambat atau prognosis yang lebih baik dengan tidak adanya kemoterapi adjuvan.
18q LOH	LOH somatik pada lokasi kromosom 18q, tempat yang mengandung gen terkait dengan KKR (SMAD4 dan SMAD2), berhubungan dengan hasil yang lebih buruk pada pasien dengan karsinoma kolon stadium II atau stadium III karsinoma kolon dari pada pasien dengan tumor yang mempertahankan kedua alel induk di 18q.
Prediktif	
KRAS	Mutasi somatik menyebabkan aktivitas tak terbatas dari sinyal yang melalui kaskade MAPK dan PI3K. Pasien dengan KKR stadium IV dan aktivasi mutasi pada KRAS tidak memiliki respons terhadap terapi penghambat EGFR.
BRAF V600E	Mutasi somatik yang mengaktifkan kinase ini mengakibatkan sinyal jalur MAPK yang tidak terbatas. Pasien dengan KKR stadium IV dan aktivasi mutasi BRAF V600E tidak memiliki respons terhadap terapi penghambat EGFR.
Metilasi MLH1 yang berhubungan peredaman (silencing)	Kehilangan dari fungsi MMR berkontribusi dalam hilangnya supresor tumor (TGFBR2 dan BAX). Pasien dengan tumor defisiensi MMR tidak responsif terhadap <i>flourouracil</i> dan berespons lebih baik pada rejimen dengan kandungan <i>irinotecan</i>

LOH: *Loss of Heterozygosity*
 KKR: Karsinoma Kolorektal
 BAX : *BAC12-associated X Protein*
 EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*
 MAPK : *Mitogen-activated Protein Kinase*
 PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase*
 TGFBR2 : *Transforming Growth Factor Receptor β type II*

2.5.4. Riwayat Keluarga dan Silsilah dalam Menentukan Risiko Hereditas

Lima sampai sepuluh persen kanker dikategorikan kanker herediter, selebihnya akibat pengaruh lingkungan. Penting untuk mengetahui silsilah adanya keturunan kanker pada keluarga. Riwayat keluarga merupakan hal yang penting dalam menentukan risiko herediter. Hukum keturunan Mendelian dapat mengevaluasi risiko penyakit pada keluarga yang terdampak. Keturunan pertama dari KKR mempunyai risiko dua sampai tiga kali dari pada populasi umum. Risiko ini memicu inisiasi skrining kolonoskopi pada usia 40 tahun, 10 tahun lebih awal dari skrining populasi umum. Risiko ini bahkan meningkat jika terdapat dua atau lebih keluarga yang menderita penyakit yang sama. Sebagian kanker sporadik terdapat predisposisi yang berhubungan varian keluarga pada satu atau lebih gen. Sebagian kanker menunjukkan peningkatan insiden familial tanpa gambaran Mendelian yang jelas (Nussbaum RL et al. 2016).

Pada warisan gen tunggal, risiko pada anggota keluarga biasanya dapat ditentukan dari prinsip dasar Mendelian. Namun, perhitungan risiko tidak mudah pada gen yang kurang penetran, variasi ekspresi atau akibat mutasi baru. Dalam keadaan ini estimasi risiko Mendelian dapat dimodifikasi dengan menggunakan probabilitas kondisi (*condition probability*) terhadap pedigri. Keadaan penetrasi tidak lengkap (*incomplete penetrance*) dan onset lambat (*late onset*) pada autosomal dominan merupakan dua masalah dalam menetapkan risiko berulang pada anggota keluarga. Perhitungan risiko empiris dapat digunakan untuk sifat kelainan yang kompleks. Namun, dengan berjalannya waktu penelitian risiko empiris telah usang dan digantikan oleh risiko individu berdasarkan *genotype* dan paparan lingkungan (Nussbaum RL et al 2016, Turnpenny PD et al 2017, Buckingham L 2011, Vogelstein B et al 2013).

Sindroma KKR herediter familial adalah autosom dominan gen APC terletak pada kromosom 5q21. *Sindroma Lynch* juga autosom dominan untuk hMLH1 berlokasi pada kromosom 3p21, hMSH2 pada 2p21-22, hMSH6 pada 2p16, hPMS1 pada 2q31, hPMS2 pada 7p22, dan TACSTD1 pada 2p21. MSH2 dan MLH1 adalah yang paling berhubungan dengan HNPCC. MLH1 lebih sering terdapat pada KKR sporadik (Turnpenny PD, Ellard S. 2017).

Studi genetik kebanyakan terpusat pada sekuensing DNA polimorfisme sebagai dasar perbedaan individu pada penyakit yang diduga. Studi ekspresi mRNA dan analisis protein belum dilakukan secara reguler. Kesalahannya jarang karena pembacaan

proof reading dan mekanisme perbaikan memastikan ketepatan dari transkrip. Edit mRNA dilakukan oleh enzim dengan target mRNA *post* transkripsi (Li M et al 2011; Hatta et al, 2017).

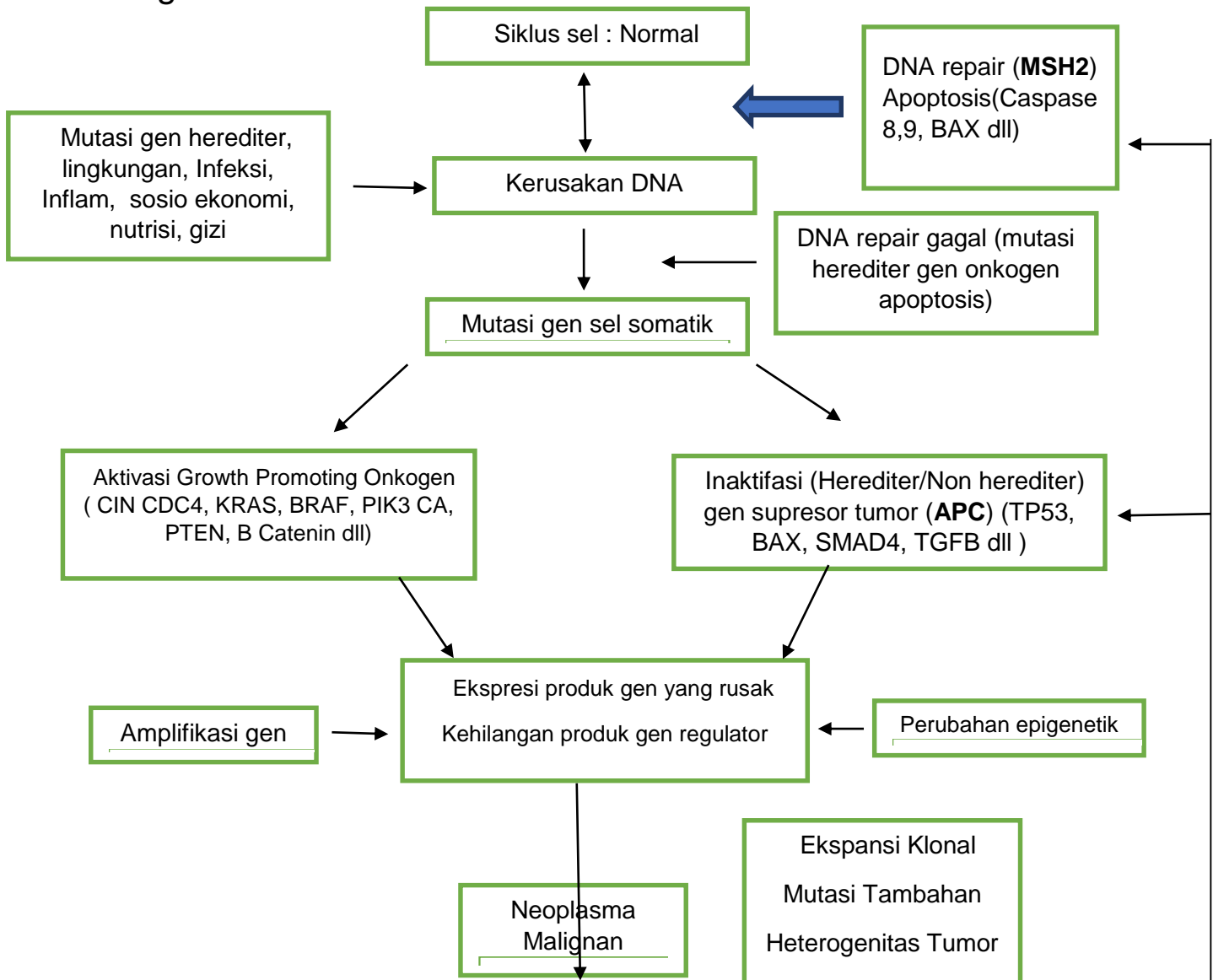
Skrining dengan kriteria Amsterdan dan Bethesda untuk KKR herediter sering sulit, khususnya pada anggota keluarga kecil dan onset penyakit pada usia lanjut. Untuk menentukan risiko KKR heriditer pada keluarga dibutuhkan riwayat keluarga pada pedigri sebagai dasar prinsip Mendelian dan informasi ekspresi molekul dari gen herediter (Turnpeeny et al, 2017).

Kalkulasi risiko pada konseling umum membutuhkan pengetahuan dan pengertian dari teori probabilitas dasar. Teori Bayesian menggabungkan risiko awal (*prior risk*) yang dimodifikasi dengan informasi kondisi (*condition information*) memberikan probabilitas secara keseluruhan dari risiko untuk kejadian tertentu seperti status karier (Turnpenny PD et al 2017, Guttmacher AE et al 2004, Brock JAK et al 2010, Bennett RL et al 2008).

BAB III

Kerangka Teori, Kerangka Konsep dan Definisi Operasional

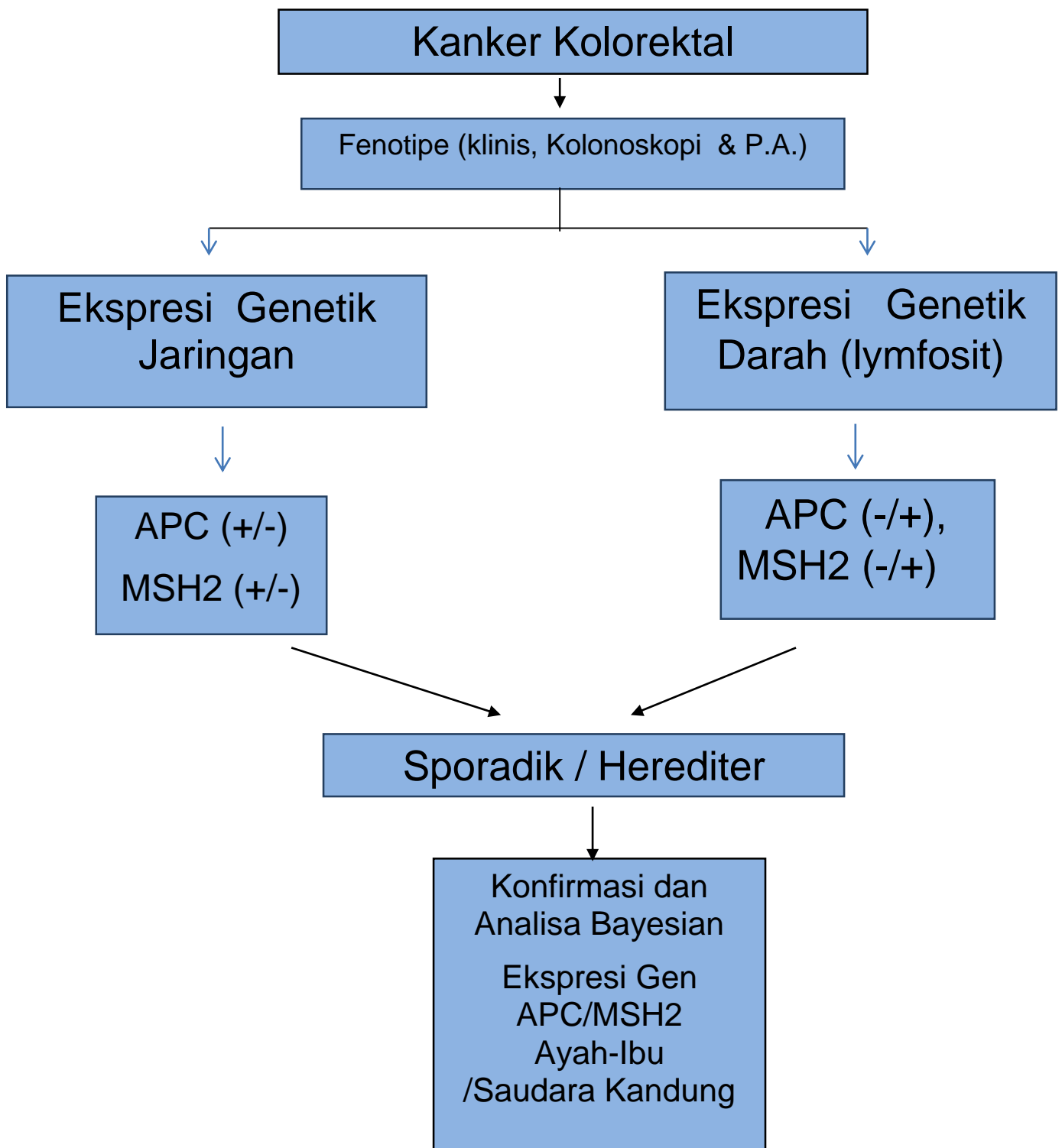
Kerangka Teori



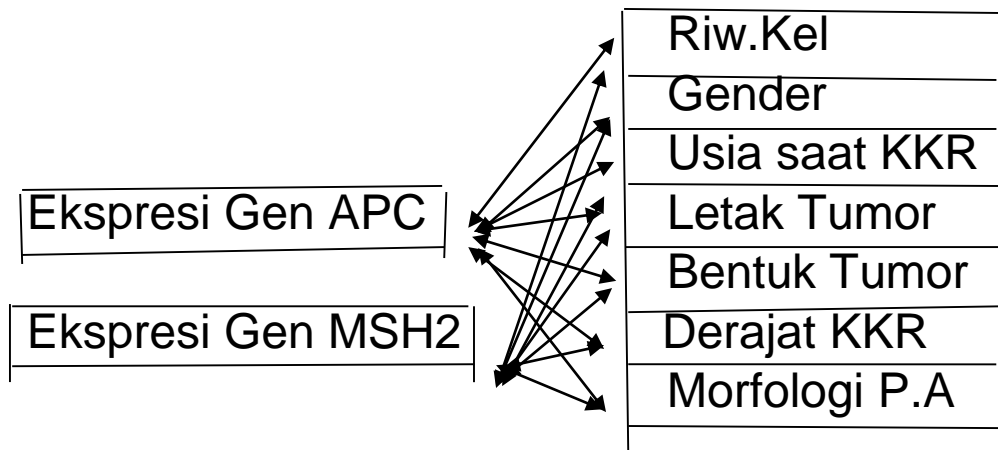
Perubahan genetik dan epigenetik (Peran gen APC dan MSH2) terhadap kerusakan DNA yang Menyebabkan Kanker Kolorektal

Kerangka Konsep:

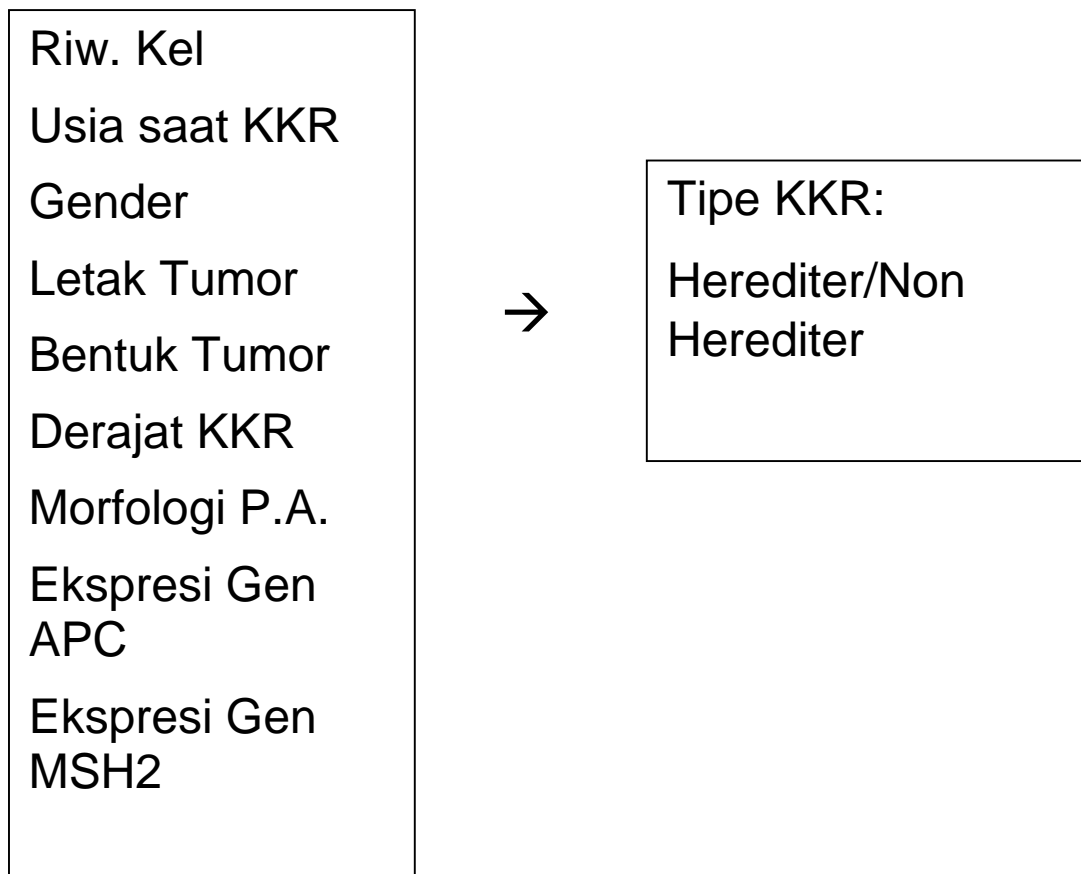
Tahap 1:



Tahap 2.



Tahap 3. Skoring sistem

**Definisi Operasional:**

Kanker kolorektal (KKR): KKR yang berobat ke RS. Diagnosa dilakukan dengan cara: anamnesa, pemeriksaan fisik, massa tumor pada kolonoskopi yang dipastikan dengan patologi anatomi (P.A.).

Gender: Laki-laki atau Wanita. Cara pengukuran: Anamnesis. Skala: nominal

Usia pasien yaitu Usia saat ditemukan KKR. Cara pengukuran: Anamnesis. Skala: ratio

Fenotip KKR: Bentuk tumor, letak tumor pada kolon dan kelainan patologi anatomi dari KKR: Cara pengukuran: Kolonoskopi: Skala: nominal polikotom. P.A. Skala: Ordinal.

Derajat KKR: Derajat berdasarkan CT Scan atau post operasi dengan sistim Duke atau TNM system. Skala: Ordinal

KKR FAP: KKR dengan ekspresi RNA yang rendah gen germinal APC di jaringan tumor maupun darah. Cara pengukuran: Real time PCR pada sel tumor dan sel darah. Skala: numerik

KKR HNPCC: KKR dengan ekspresi RNA yang rendah gen geminal MSH2 di jaringan tumor maupun darah. Cara pengukuran: Real time PCR pada sel tumor dan sel darah. Skala: numerik

Mutasi somatik: Ekspresi RNA yang rendah gen APC atau MSH2 pada sel tumor tanpa ekspresi RNA yang rendah di darah. Cara pengukuran: Real time PCR. Skala: Numerik

Mutasi germinal: Ekspresi gen yang sama rendah pada sel tumor KKR dan darah. Cara pengukuran: Real time PCR. Numerik.

Konfirmasi Mutasi pada keluarga: Ekspresi gen APC dan atau MSH2 yang rendah pada keluarga sedarah (orang tua atau saudara kandung) jika Ekspresi APC dan atau MSH2 rendah pada sel tumor maupun darah.

Analisa Bayesian: Menentukan risiko KKR herediter pada keluarga pasien (Proband). Dibutuhkan riwayat pedigri dengan prinsip Mendel dan deteksi langsung mutasi molekuler gen herediter. Analisa Bayesian menilai Risiko awal (*Prior risk*) dengan modifikasi informasi lain (*conditional information*) untuk mendapatkan probabilitas risiko status bawaan secara keseluruhan.

	Definisi	Cara Pengukuran	Skala
KKR	KKR pasien yg berobat di RS	Anamnesa, Kolonoskopi & P.A.	Diskriptif

Jenis kelamin	Laki/Perempuan	Anamnesa	Nominal Dikotom
Usia saat KKR	Tahun	Anamnesa	Ratio
Kanker Kolorektal	Letak KKR pada kolon Bentuk KKR pada kolon	Kolonoskopi Kolonoskopi	Nominal Polikotom Nominal Polikotom
Patologi Anatomi dari KKR	Kelainan P.A. pada KKR	Pemeriksaan P.A.	Ordinal
KKR pada FAP	KKR akibat mutasi germinal gen APC.	Real time PCR pada tumor dan darah	Numerik
KKR pada HNPCC	KKR akibat mutasi germinal gen MSH2.	Real time PCR pada tumor dan darah	Numerik
Derajat KKR	Derajat klinis Duke/TNM	CT Scan/Post operasi	Ordinal
Bayesian analisis	Probabilitas risiko KKR pada keluarga dengan riwayat keturunan (+) (Proband)	Pedigri KKR Real time PCR APC dan MSH2	Numerik

BAB IV

Metode Penelitian

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif dan analitik studi potong lintang (*cross-sectional study*). Sampling teknik: *Non probability Consecutive Sample*.

Tahap pertama, Menentukan nilai ekspresi RNA gen APC dan MSH2 pada kontrol subjek dan pada sel tumor serta darah pasien KKR. Mendapatkan fenotip tumor dan klinis pasien,

Tahap kedua, (1). melakukan korelasi ekspresi Gen APC dan Gen MSH2 darah dengan Usia, Gender, Usia, Letak tumor, Bentuk tumor, P.A tumor, Derajat KKR dan Riwayat keluarga. (2). mencari nilai skoring probabilitas KKR herediter berdasarkan ekspresi genetik APC dan MSH2 pada darah (limfosit) pasien dengan Riwayat keluarga, Usia, Gender, Letak Tumor, Bentuk Tumor, Derajat KKR, Kelainan histopatologi.

Tahap ketiga, uji hipotesis probabilitas KKR berulang (*recurrence risk factor*) melalui pedigri dan ekspresi gen APC & MSH2 pada keluarga pasien (orang tua / saudara kandung) yang mempunyai riwayat keluarga keturunan KKR.

Tahap empat, perhitungan Analisa Bayesien terhadap Proband.

Pemeriksaan Ekspresi mRNA gen APC dan MSH2.dilakukan terhadap: 1. Jaringan tumor 2. Darah pasien 3. Darah orang normal sebagai kontrol 4. Darah orang tua, anak atau saudara kandung dengan riwayat keturunan KKR

4.2.Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat:

Divisi Gastroenterologi SMF I.Penyakit Dalam RSUD Tarakan

Dep. Patologi – Anatomi RSUD Tarakan

Laboratorium Molekuler Biologi dan Imunologi FK UNHAS

Waktu : Mei 2018– Desember 2019

4.3. Populasi Penelitian

Subjek KKR yang berobat ke RSUD Tarakan, dan RS Siloam Karawaci

4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi: Pasien Kanker Kolorektal

Orang normal sebagai kontrol dengan *matching*.

Orang tua atau saudara kandung (Proband) jika didapatkan riwayat herediter KKR.

Kriteria Eksklusi:

Pasien yang menderita penyakit kanker lain.

Pasien mendapatkan kemoterapi atau radioterapi

Inflammatory Bowel Disease

Menolak ikut dalam penelitian

4.5. Estimasi Besar Sampel

Besar sampel digunakan rumus Lemeshow:

$$N = \frac{Z(\alpha)^2 \cdot P \cdot Q}{d^2}$$

N = Jumlah sampel

Z(α) : 1,96

d = Presisi 10% → 0,1

P = Proporsi kanker kolorektal (Globocan 2012) : 9,3% → 0,093

Q = 1 - P : 1 - 0,093 → 0,907

$$\begin{aligned} N &= \frac{1,96^2 \cdot 0,093 \cdot 0,907}{0,1^2} \\ &= 32,40428016 \\ &\approx 32 \end{aligned}$$

Perhitungan *drop out* sampel ditambah 10% : N = 35 .

Besar sampel untuk uji koefisien korelasi hubungan numerik bivariat sebagai berikut

$$n = \left[\frac{Z\alpha + Z\beta}{0,5 \ln \left[\frac{(1+r)}{(1-r)} \right]} \right]^2 + 3$$

Tingkat kepercayaan 95% maka $Z\alpha = 5\% = 1,96$

$Z\beta$ didapatkan 1,28, $r = 0,6$ (kepuustakaan)

Dari perhitungan besar sampel yang diperlukan N= 30

Besar sampel kontrol: orang normal dari darah (APC dan MSH2) dengan matching 30 orang.

Sampel darah untuk konfirmasi keluarga: dengan dugaan KKR herediter 10 % KKR:
N = 4.

Teori Bayesien

Estimasi risiko pada keluarga berdasarkan prinsip genetik. Riwayat bawaan Mendelian dan metode genetik molekuler untuk deteksi mutasi. Perhitungan probabilitas dilakukan menggunakan rumus Bayes (Prior Probability and Posterior Probability). (Nussbaum RL et al, 2016, Brock JAK et al, 2010)

$$P(A|B) = \frac{P(B|A) \times P(A)}{P(B)}$$

$$\text{Prior } E(\beta) = \int \beta p(\beta | Y, \theta) d\beta$$

Posterior Probability:

$$p(\beta | Y, n) = \frac{p(Y, \beta | \theta)}{p(Y | \theta)} = \frac{p(Y, \beta | \theta)}{\int p(Y, u | \theta) du} = \frac{f(Y | \beta) \pi(\beta | \theta)}{\int f(Y | u) \pi(u | \theta) du}$$

4.6. Etik dan *Informed Consent*

Keterangan lolos kaji kode etik didapatkan dari Komite etik penelitian kesehatan FK Unhas. No 884/H4.8.45.31/PP31-Komite/208. 28 Oktober 2018. Persetujuan setelah penjelasan (*informed concern*) diminta dari calon subjek atau keluarganya.

4.7. Cara Kerja

Pasien Kanker Kolorektal KKR yang datang ke poliklinik rawat jalan maupun rawat inap memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan anamnesa, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium, Torak foto, USG dan CT Scan abdomen serta Kolonoskopi. Jaringan tumor dari biopsi dipisahkan pada 2 tabung yang berbeda. Tabung 1. Berisi pengawet formalin untuk pemeriksaan P.A. Tabung 2. Jaringan segar segera disimpan dalam L6 bufer untuk pemeriksaan *realtime* PCR terhadap ekspresi mRNA gen APC dan gen MSH2. Tabung 3. Darah whole blood 100 uL dari vena lengan untuk pemeriksaan *realtime* PCR darah untuk pemeriksaan ekspresi mRNA gen APC dan MSH2. 4. Darah vena pada orang tua atau keluarga dengan riwayat keturunan KKR untuk pemeriksaan ekspresi mRNA gen APC dan MSH2.

Koleksi sampel dan Pengukuran ekspresi APC dan MSH2

Sampel jaringan diambil saat kolonoskopi pada subjek KKR. Sampel darah *whole blood* 0,3 ml diambil menggunakan needle 1 cc. Kedua sampel dimasukkan dalam

tabung pengawet L6 secara terpisah. Pengukuran mRNA kuantitatif APC dan MSH2 menggunakan *real time* PCR assay. Analisa hasil menggunakan Bio-Rad CFX Manager 3.1 software (Biorad, USA)

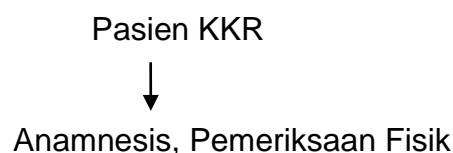
Teknik PCR:

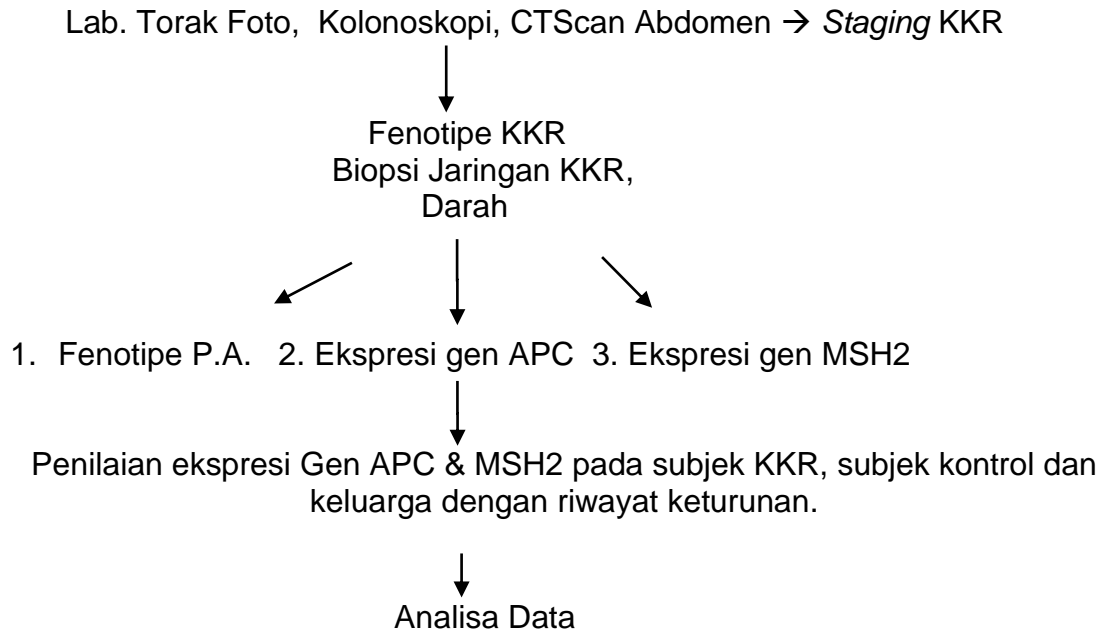
Amplicon APC: 89 bp, GAPDH 81 bp, MSH2 215 bp, hBeta actin 109 bp. Menggunakan specific oligonucleotide primer gen target's dari MSH2 dan APC. Beta actin dan CTNNB1 sebagai housekeeping gene (internal control).

Primers sequences gen mRNA MSH2 dan Beta actin (housekeeping gene) adalah sebagai berikut: MSH2_For: CATCCAGGCATGCTTGTGTTGA and MSH2_rev: GCAGTCCACAATGGACACTTC. Primer Housekeeping gene adalah sebagai berikut: Beta actin_For: ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGAT and Beta actin_Rev: CTTGCACATGCCGGAGCCGTT. Primer sequences dari gen mRNA APC dan GAPDH (housekeeping gene) adalah sebagai berikut: APC For: 5' TGTCCCTCCGTTCTTATGGAA 3' and APC Rev: 5' TCTTGAAATGAACCCATAGGAA 3'. Primer sekuen housekeeping gene adalah sebagai berikut: GAPDH For: 5'CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT 3' and GAPDH Rev: 5' CCATGGTGTCTGAGCGATGT 3' .

Deteksi mRNA gen APC dan MSH2 dilakukan menggunakan primer spesifik forward and Reverse protokol PCR: dengan siklus multiplikasi DNA pada 94°C selama 3 minutes. Siklus diulang 38 kali pada 54°C selama 30 seconds. Pengukuran qRT-PCR dilakukan dengan menggunakan Green QRT-PCR master mix kit, one stage. Protokol dioptimasi untuk CFX Connect system instrument, real time PCR 96 well 0.1 ml (Biorad Laboratories, USA). Protokol disesuaikan dengan perubahan pengenceran pewarna berdasarkan rekomendasi industry manufaktur untuk program siklus RT-PCR. (Zhiheng Zhou et al 2015, Hatta M et al 2017, Sirait RH et al 2017, Tambaip T et al 2018 , NW FACULTY 2019).

4.8. Alur Penelitian





4.9. Pengolahan dan Analisa Data

Data diperoleh secara diskriptif dan analitik

1. Anamnesa usia dan keturunan KKR untuk menilai KKR sporadik / herediter / familial pasien
2. Pemeriksaan fisik dan kolonoskopi serta penunjang Torak foto dan CT Scan abdomen untuk menentukan stadium KKR.
3. Pemeriksaan P.A. dan derajat KKR
4. Pemeriksaan ekspresi mRNA gen APC sel tumor dan darah subjek KKR
5. Pemeriksaan ekspresi mRNA gen MSH2 sel tumor dan darah subjek KKR
6. Pemeriksaan ekspresi mRNA APC dan MSH2 pada darah orang normal
7. Pemeriksaan ekspresi mRNA APC dan MSH2 pada Proband
8. Analisa data nilai ekspresi mRNA gen APC pada sel tumor dan darah
9. Analisa data nilai ekspresi mRNA gen MSH2 pada sel tumor dan darah
10. Uji koefisien korelasi hubungan numerik bivariat
11. Analisa Korelasi-Regresi, Multivarian Regresi logistik, Bayesian analisis

BAB IV

Hasil Penelitian

G. Karakter pasien dan kelompok kontrol

Jumlah total subjek yang masuk dalam penelitian 40 pasien kanker kolorektal (KKR) dan 31 subjek kontrol. Tidak terdapat perbedaan bermakna karakteristik pasien KKR dan subjek kontrol.

Delapan subjek KKR mempunyai riwayat keluarga menderita KKR. Empat keluarga dengan 10 *Proband* setelah dilakukan *informed consent* dapat dikaji *pedigree* keluarga, evaluasi ekspresi mRNA PCR gen APC dan MSH2 serta analisis Bayesian.

A.1. Karakteristik KKR dan subjek kontrol

Tabel 1. Karakteristik Dasar

Variabel	Klasifikasi		
	KKR (n=40)	Kelompok kontrol (n=31)	p
Usia (Tahun)	56,80 ± 8,40	51,61±13,44	p > 0.05
Jenis kelamin Laki-laki	21 (52,5)	13 (41,9)	p > 0.05
Wanita	19 (47,5)	18 (58,1)	p > 0.05
Indeks Massa Tubuh	22,41 ± 3,29	23,62±3,41	p > 0.05

Variabel kategorik disajikan dengan n (%), variabel numerik distribusi normal disajikan dengan nilai rerata ± simpang baku. Data missing 0 (n=30)

Analisa: Tidak terdapat perbedaan bermakna karakteristik KKR dan subjek kontrol.

A.2 Deskripsi APC dan MSH pada Kelompok Kontrol

Tabel 2. Ekspresi APC dan MSH Kelompok Kontrol (*Fold Change*)

	APC (n=31)	MSH (n=31)
Deskripsi	13.261,74 ± 670,55	12.219,87±756,87
Persentil 1	12.080,00	11.029,00
Persentil 3	12.080,00	11.029,00
Persentil 5	12.195,80	11.059,60

Analisa: 1. Nilai rerata ekspresi APC darah pada kelompok kontrol $13.261,74 \pm 670,55$

dan MSH darah $12.219,87 \pm 756,87$. (Fold Change).

2. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara persentil 1, 3 dan 5.

A.3 Titik Potong

Penentuan titik potong berdasarkan persentil 5

Tabel 3. Penentuan Titik Potong APC dan MSH Berdasarkan Persentil 5

Variabel	Titik potong mutasi berdasar persentil 5	Klasifikasi
APC	12.195,80	APC \leq 12.195,80 APC $>$ 12.195,80
MSH	11.059,60	MSH \leq 11.059,60 MSH $>$ 11.059,60

Titik potong nilai bawah APC adalah 12.195,80 dan MSH2 adalah 11.059,60 (Fold Change)

H. Deskripsi APC dan MSH (Darah dan Jaringan) pada Pasien Kanker Kolorektal

B.1 Deskripsi APC dan MSH (Darah dan Jaringan) subjek KKR

Tabel 4a. Deskripsi APC dan MSH (Darah dan Jaringan) pada KKR

Variabel	Deskripsi (n=40)
APC darah	12.156,50 (5.848,00-15.035,00)
APC jaringan	8.147,77 \pm 1.875,12
MSH darah	11.411,05 (4.230,00-14.559,00)
MSH jaringan	7.485,00 (4.174,00-14.218,00)

Variabel numerik distribusi normal disajikan dengan nilai rerata \pm simpang baku, variabel numerik tidak berdistribusi normal disajikan dengan median (minimum-maksimum).

Tabel 4b. Hasil Analisis Perbandingan Kadar APC dan MSH Darah antara Subjek KKR dan Kelompok Kontrol.

Ekspresi Gen (Darah)	Subjek KKR (n = 40)	Subjek kontrol (n = 31)	p
APC			
• median (range)	12 156.50 (5 848.00 – 15 035.00) fc	13 260.00 (12 080 – 14 376.00) fc	0.014
• mean \pm SD	11 578.68 \pm 2 638.23 fc	13 261.74 \pm 670.56 fc	0.014
MSH2			
• median (range)	12 554.50 (4 230.00 – 14 559.00) fc	12 146.00 (11 029.00 – 13 633.00) fc	0.116
• mean \pm SD	11 411.05 \pm 2 912.45 fc	12 219.87 \pm 756.87 fc	0.465
Uji Mann-Whitney			

Interpretasi

1. Hasil uji Mann-Whitney APC darah menunjukkan nilai $p=0,014$, terdapat perbedaan bermakna APC darah antara kelompok pasien kolorektal dan kelompok kontrol.
2. Hasil uji Mann-Whitney MSH darah menunjukkan nilai $p=0,116$, terdapat perbedaan tidak bermakna MSH darah antara kelompok pasien kolorektal dan kelompok kontrol karena adanya *outlier*.

B.2 Prevalensi Ekspresi pada Pasien Kanker Kolorektal

Tabel 5. Prevalensi Ekspresi pada Pasien Kanker Kolorektal

Variabel	Deskripsi (n=40)	
APC darah	≤12.195,80	20 (50,0)
	>12.195,80	20 (50,0)
APC jaringan	≤12.195,80	39 (97,5)
	>12.195,80	1 (2,5)
MSH darah	≤11.059,60	13 (32,5)
	>11.059,60	27 (67,5)
MSH jaringan	≤11.059,60	39 (97,5)
	>11.059,60	1 (2,5)
APC	Darah≤12.195,80 dan jaringan≤ 12.195,80	20 (50,0)
	Darah>12.195,80 dan jaringan≤ 12.195,80	19 (47,5)
	Darah>12.195,80 dan jaringan>12.195,80	1 (2,5)
MSH	Darah≤11.059,60 dan jaringan≤ 11.059,60	13 (32,5)
	Darah>11.059,60 dan jaringan≤ 11.059,60	26 (65,0)
APC dan MSD darah	APC darah ≤ 12.195,8 dan MSH darah ≤ 11.059,6	12 (30%)
	APC darah ≤ 12.195,8 dan MSH darah > 11.059,6	8 (20%)
	APC darah > 12.195,8 dan MSH darah ≤ 11.059,6	1 (2,5%)
	APC darah > 12.195,8 dan MSH darah > 11.1059,6	19 (47,5%)

Variabel kategorik disajikan dalam n (%)

B. 3. Prevalensi Herediter pada Kanker kolorektal

Table 6. Prevalensi Herediter pada kelompok Kanker Kolorektal

Variabel	Deskripsi (n=40)	
Herediter berdasarkan APC	Herediter	20 (50,0)
	Non-Herediter	20 (50,0)
Herediter berdasarkan MSH2	Herediter	13 (32,5)
	Non-Herediter	27 (67,5)
Herediter berdasarkan APC and MSH2	Herediter	21 (52,5)
	Non-Herediter	19 (47,5)

Variabel katagorik disajikan dalam n (%)

Analisa: Dari 40 KKR didapatkan Prevalensi herediter berdasarkan: 1. APC darah: ≤ 12.195,80 and APC jaringan ≤ 12.195,80: 20 pasien (50 %). 2. MSH2: darah ≤ 11.059,60 and MSH2 jaringan ≤ 11.059,60: 13 pts (32,5%). 3. APC and MSH: 21 patients (52,5 %).

C. Hubungan Faktor Risiko dengan Herediter

C.1 Analisis Bivarian Hubungan antara Usia, Jenis Kelamin, Letak, Staging, Riwayat Keluarga, Diferensiasi P.A. dengan Herediter berdasarkan APC

Tabel 7. Hubungan Faktor Risiko dengan Herediter Berdasarkan APC

Variabel	Herediter berdasarkan APC		OR/selisih (IK95%)	Nilai p
	Herediter (n=20)	Non herediter (n=20)		
Usia^a	54,65 ± 13,18	58,95 ± 13,53	-4,30 (-12,85-4,25)	0,315
Usia^b				
<50	9 (64,3%)	5 (35,7%)	2,45 (0,64-9,39)	0,320
>50	11 (42,3%)	15 (57,7%)		
Jenis kelamin^b				
Laki-laki	9 (42,9%)	12 (57,1%)	0,54 (0,15-1,91)	0,527
Perempuan	11 (57,9%)	8 (42,1%)		
Letak^c				
Caecum	1 (50,0%)	1 (50,0%)	-	0,909
Colon Ascenden	3 (50,0%)	3 (50,0%)		
Colon Transversum	2 (50,0%)	2 (50,0%)		
Colon Descenden	0 (0,0%)	1 (100,0%)		
Colon Sigmoid	6 (60,0%)	4 (40,0%)		
Rectum	8 (47,1%)	9 (52,9%)		
Letak^b				
Colon Proximal	6 (50,0%)	6 (50,0%)	1,00 (0,26-3,87)	1,000
Colon Distal	14 (50,0%)	14 (50,0%)		
Staging^c				
A	2 (28,6%)	5 (71,4%)	-	0,012
B	4 (28,6%)	10 (71,4%)		
C	12 (75,0%)	4 (25,0%)		
D	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
Staging^b				
C-D	14 (73,7%)	5 (26,3%)	7,00 (1,74-28,17)	0,011
A-B	6 (28,6%)	15 (71,4%)		
Riwayat Keluarga^b				
Ya	8 (66,7%)	4 (33,3%)	2,67 (0,65-10,97)	0,301
Tidak	12 (42,9%)	16 (57,1%)		
Diferensiasi^{c*}				
Buruk	5 (71,4%)	2 (28,6%)	3,41 (0,56 -20,94)	0,185
Sedang	3 (50,0%)	3 (50,0%)	1,36 (0,23 - 8,08)	0,733
Baik	11 (42,3%)	15 (57,7%)		

^a Uji t tidak berpasangan, disajikan dalam rerata ± simpang baku, selisih (IK95%), dan nilai p

^b Uji *chi square*, disajikan dalam n (%), OR (IK95%), dan nilai p

^c Uji Mann Whitney, disajikan dalam n (%) dan nilai p

* n = 39, satu subjek tidak ada data diferensiasi. Nilai p diferensiasi = 0,212

Analisa berdasarkan gen APC:

1. Peluang yang bermakna sebagai KKR herediter terdapat pada staging KKR. (OR 7,00).
2. Peluang faktor risiko yang tidak bermakna sebagai KKR herediter terdapat pada Usia OR 2,45. dan Riwayat keluarga OR 2,67.
3. Tidak terdapat peluang herediter; Jenis kelamin (OR 0,54), letak tumor (OR 1,0), Dif. Histopatologi

C.2 Analisis Bivarian Hubungan antara Usia, Jenis Kelamin, Letak, Staging, Riwayat Keluarga, Diferensiasi P.A. dengan Herediter berdasarkan MSH2

Tabel 8. Hubungan Faktor Resiko dengan Herediter Berdasarkan MSH2

Variabel	Herediter berdasarkan MSH			Nilai p
	Hereditier (n=13)	Non hereditier (n=27)	OR/selisih (IK95%)	
Usia^a	50,69 ±14,99	59,74±11,68	-9,05 (-17,81-(-0,28))	0,043
Usia^b				
<50	8 (57,1%)	6 (42,9%)	5,60 (1,33-23,62)	0,031
>50	5 (19,2%)	21 (80,8%)		
Jenis kelamin^c				
Laki-laki	6 (28,6%)	15 (71,4%)	0,69 (0,18-2,59)	0,826
Perempuan	7 (36,8%)	12 (63,2%)		
Letak^d				
Caecum	1 (50,0%)	1 (50,0%)	-	0,595
Colon Ascenden	2 (33,3%)	4 (66,7%)		
Colon Transversum	2 (50,0%)	2 (50,0%)		
Colon Descenden	0 (0,0%)	1 (100,0%)		
Colon Sigmoid	3 (30,0%)	7 (70,0%)		
Rectum	5 (29,4%)	12 (70,6%)		
Letak^b				
Colon Proksimal	5 (41,7%)	7 (58,3%)	1,79 (0,44-7,32)	0,476
Colon Distal	8 (28,6%)	20 (71,4%)		
Staging^d				
A	0 (0,0%)	7 (100,0%)	-	0,020
B	4 (28,6%)	10 (71,4%)		
C	7 (43,8%)	9 (56,3%)		
D	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
Staging^c				
C-D	9 (47,4%)	10 (52,6%)	3,83 (0,93-15,72)	0,116
A-B	4 (19,0%)	17 (81,0%)		
Riwayat Keluarga^b				
Ya	8 (66,7%)	4 (33,3%)	9,20 (1,97-42,97)	0,008
Tidak	5 (17,9%)	23 (82,1%)		
Diferensiasi^{d*}				
Buruk	4 (57,1%)	3 (42,9%)	2,52 (0,46 - 13,80)	0,287
Sedang	0 (0,0%)	6 (100,0%)	-	0,999
Baik	9 (84,6%)	17 (65,4%)		

^a Uji t tidak berpasangan, disajikan dalam rerata ± simpang baku, selisih (IK95%), dan nilai p

^b Uji *fisher's exact*, disajikan dalam n (%), OR (IK95%), dan nilai p

^c Uji *chi square*, disajikan dalam n (%), OR (IK95%), dan nilai p

^d Uji Mann Whitney, disajikan dalam n (%) dan nilai p

* n = 39, satu subjek tidak ada data diferensiasi. Nilai p diferensiasi = 0,844

Analisa:

1. Peluang yang bermakna sebagai risiko herediter KKR pada usia < 50 tahun (OR 5,60) dan riwayat keluarga yang positif (OR 9,20).
2. Peluang yang tidak bermakna sebagai KKR herediter pada staging KKR (OR 3,83).
3. Tidak terdapat peluang sebagai KKR herediter pada jenis kelamin (OR 0,69), letak KKR (OR 1,79) dan diferensiasi histopatologi.

C.3 Analisis Hubungan antara Usia, Jenis Kelamin, Letak, Staging, Riwayat Keluarga dan Diferensiasi P.A. dengan Herediter berdasarkan APC dan MSH2

Tabel 9. Hubungan Faktor Risiko dengan Herediter Berdasarkan APC dan MSH2

Variabel	Herediter berdasarkan APC dan MSH		OR/selisih (IK95%)	Nilai p
	Herediter (n=21)	Non herediter (n=19)		
Usia^a	53,43 ± 14,02	60,52 ± 11,87	-7,09 (15,46-1,26)	0,094
Usia^b				
<50	10 (71,4%)	4 (28,6%)	3,41 (0,84-13,77)	0,154
>50	11 (42,3%)	15 (57,7%)		
Jenis kelamin^b				
Laki-laki	10 (47,6%)	11 (52,4%)	0,66 (0,19-2,31)	0,739
Perempuan	11 (57,9%)	8 (42,1%)		
Letak^c				
Caecum	1 (50,0%)	1 (50,0%)	-	0,831
Colon Ascenden	3 (50,0%)	3 (50,0%)		
Colon Transversum	2 (50,0%)	2 (50,0%)		
Colon Descenden	0 (0,0%)	1 (100,0%)		
Colon Sigmoid	6 (60,0%)	4 (40,0%)		
Rectum	9 (52,9%)	8 (47,1%)		
Letak^b				
Colon Proximal	6 (50,0%)	6 (50,0%)	0,87 (0,22-3,35)	1,000
Colon Distal	15 (53,6%)	13 (46,4%)		
Staging^c				
A	2 (28,6%)	5 (71,4%)	-	0,018
B	5 (35,7%)	9 (64,3%)		
C	12 (75,0%)	4 (25,0%)		
D	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
Staging^b				
C-D	14 (73,7%)	5 (26,3%)	5,60 (1,43-21,95)	0,010
A-B	7 (33,3%)	14 (66,7%)		
Riwayat Keluarga^b				
Ya	9 (75,0%)	3 (25,0%)	4,00 (0,89-18,03)	0,128
Tidak	12 (42,9%)	16 (57,1%)		
Diferensiasi^{c*}				
Buruk	5 (71,4%)	19 (48,7%)	2,92 (0,48 - 17,86)	0,247
Sedang	3 (50,0%)	3 (50,0%)	1,17 (0,20 - 6,89)	0,865
Baik	12 (46,2%)	14 (53,8%)		

^a Uji t tidak berpasangan, disajikan dalam rerata ± simpang baku, selisih (IK95%), dan nilai p

^b Uji *chi square*, disajikan dalam n (%), OR (IK95%), dan nilai p

^c Uji Mann Whitney, disajikan dalam n (%) dan nilai p

* n = 39, satu subjek tidak ada data diferensiasi

Nilai p diferensiasi = 0,304

Analisa:

1. Terdapat peluang yang bermakna KKR herediter pada staging KKR (OR 5,60)

2. Terdapat peluang yang tidak bermakna sebagai herediter pada Usia (OR 3,41) dan riwayat keluarga (OR 4,00).
3. Tidak terdapat peluang herediter pada Jenis kelamin (OR 0,66), letak KKR (OR 0,87) dan differensiasi histopatologi.

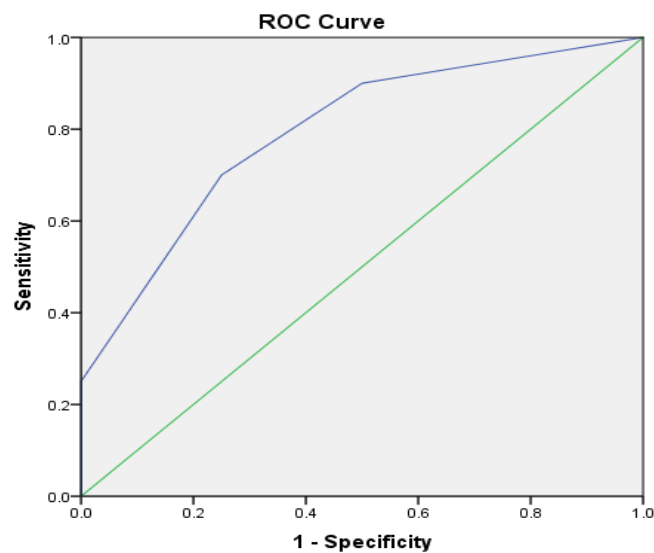
D. Analisis Multivariat

D.1 Uji Regresi Logistik Faktor Resiko KKR (Herediter berdasarkan APC)

Tabel 10. Analisis Multivariat Faktor Risiko Kanker Kolorektal (Herediter berdasarkan APC)

	Variabel	B	SE	Nilai p	OR	IK95%	
						Min	Maks
Step 1	Usia (1)	1,858	1,612	0,249	6,408	0,272	151,044
	Staging (1)	2,566	0,892	0,004	13,012	2,265	74,738
	Riwayat	-0,068	1,581	0,965	0,934	0,042	20,690
	Konstanta	-1,858	0,774	0,016	0,156		
Step 2	Usia (1)	1,800	0,922	0,051	6,051	0,994	36,843
	Staging (1)	2,562	0,888	0,004	12,965	2,273	73,932
	Konstanta	-1,855	0,772	0,016	0,156		

Uji Regresi Logistik
 Hosmer and Lameshow test (p=0,734)
 Nilai AUC=0,794 (IK 95% 0,655-0,933)



Gambar 23. Kurva ROC Nilai Probabilitas Herediter Bedasarkan APC

Tabel 10.1 Perhitungan Probabilitas pada Semua Skenario Subjek

Skenario	Usia	Staging	y	p
1	1	1	2,507	0,925
2	1	0	-0,055	0,486

3	0	1	0,707	0,669
4	0	0	-1,855	0,135
y = -1,855 + 1,800 usia + 2,562 Staging			P= 1/(1+exp[-y])	
Usia (1= <50 tahun ; 0= >50 tahun)			Staging (1= C dan D; 0=A dan B)	

Interpretasi: Analisa multivarian hasil Uji Regresi Logistik Faktor Resiko Kanker Kolorektal (Hereditas berdasarkan **APC**) menunjukkan bermakna pada staging dan usia. Skoring y = -1,855 + 1,800 usia + 2,562 Staging. (Usia 1= <50 tahun; 0= >50 tahun. Staging 1= C dan D; 0=A dan B).

D.2 Hasil Uji Regresi Logistik Faktor Resiko KKR (Hereditas berdasarkan **MSH2**)

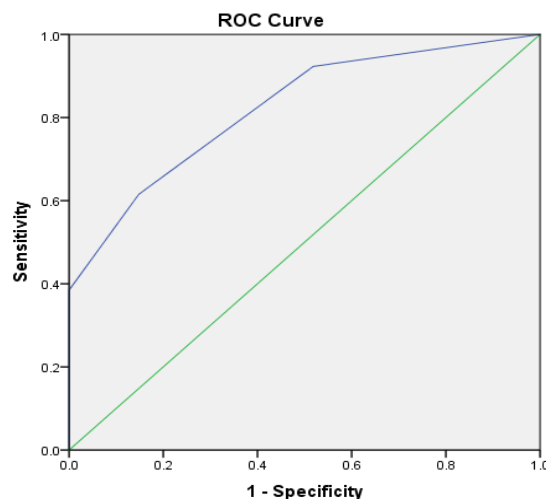
Tabel 11. Analisis Multivariat Faktor Risiko Kanker Kolorektal (Hereditas Berdasarkan MSH2)

Step	Variabel	B	SE	Nilai p	OR	IK95%	
						Min	Maks
Step 1	Usia (1)	-18,141	28420,72	0,999	0,000	0,000	0,000
	Staging (1)	2,302	1,134	0,042	9,998	1,083	92,289
	Riwayat	21,182	28420,72	0,999	1582007312,45	0,000	0,000
	Konstanta	-3,062	1,106	0,006	0,047		
Step 2	Staging (1)	2,395	1,130	0,034	10,970	1,199	100,382
	Riwayat (1)	3,126	1,143	0,006	22,784	2,423	214,273
	Konstanta	-3,165	1,094	0,004	0,042		

Uji Regresi Logistik

Hosmer and Lameshow test (p=0,611)

Nilai AUC=0,822 (IK 95% 0,678-0,966)



Diagonal segments are produced by ties.

Gambar 24. Kurva ROC Nilai Probabilitas Hereditas Berdasarkan MSH2

Tabel 11.1 Perhitungan Probabilitas pada Semua Skenario Subjek

Skenario	Riwayat	Staging	y	p
1	1	1	2,356	0,913
2	1	0	-0,039	0,490
3	0	1	-0,770	0,316
4	0	0	-3,165	0,041

$y = -3,165 + 2,395 \text{ Staging} + 3,126 \text{ Riwayat}$	$P = 1/(1+\exp[-y])$
Riwayat (1= Ya ; 0= Tidak)	Staging (1= C dan D; 0=A dan B)

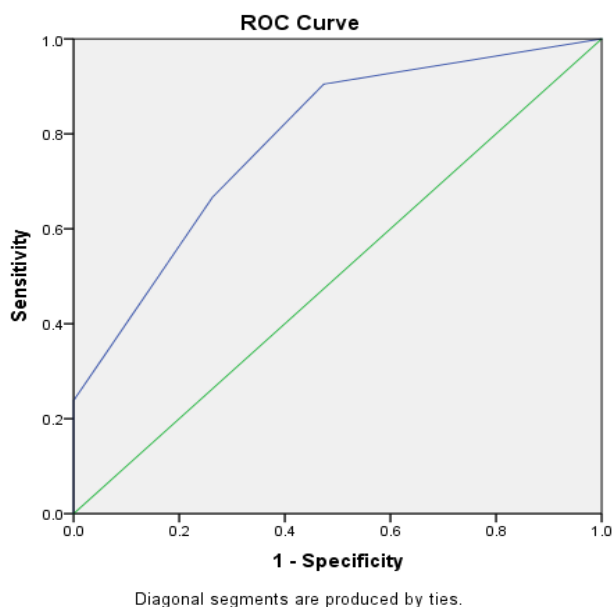
Interpretasi: Multivarian Uji Regresi Logistik Faktor Resiko KKR Herediter berdasarkan **MSH2** KKR bermakna pada staging dan riwayat. Skoring $y = -3,165 + 2,395 \text{ Staging} + 3,126 \text{ Riwayat}$. Riwayat 1= Ya ; 0= Tidak, Staging 1= C dan D; 0=A dan B)

D.3 Uji Regresi Logistik Faktor Resiko KKR (Herediter berdasarkan APC dan MSH)

Tabel 12. Analisis Multivariat Faktor Resiko Kanker Kolorektal (Herediter Berdasarkan APC dan MSH2)

	Variabel	B	SE	Nilai p	OR	IK95%	
						Min	Maks
Step 1	Usia (1)	1,776	1,610	0,270	5,909	0,252	138,679
	Staging (1)	2,447	0,904	0,007	11,556	1,966	67,914
	Riwayat	0,443	1,592	0,781	1,558	0,069	35,313
	Konstanta	-1,776	0,770	0,021	0,169		
Step 2	Usia (1)	2,140	0,943	0,023	8,503	1,339	53,993
	Staging (1)	2,466	0,899	0,006	11,775	2,023	68,536
	Konstanta	-1,789	0,769	0,020	0,167		

Uji Regresi Logistik
 Hosmer and Lameshow test (p=0,813)
 Nilai AUC=0,786 (IK 95% 0,644-0,927)



Gambar 25. Kurva ROC Nilai Probabilitas Herediter Berdasarkan APC dan MSH

Perhitungan probabilitas pada semua skenario subjek
Tabel 12.1 Perhitungan Probabilitas pada Semua Skenario Subjek

Skenario	Usia	Staging	y	p
1	1	1	2,817	0,943
2	1	0	0,351	0,587
3	0	1	0,677	0,663
4	0	0	-1,789	0,143

$y = -1,789 + 2,140 \text{ usia} + 2,466 \text{ Staging}$	$P = 1/(1+\exp[-y])$
Usia (1= <50 tahun ; 0= >50 tahun)	Staging (1= C dan D; 0=A dan B)

Interpretasi: Multivarian uji Regresi Logistik Faktor Resiko Kanker Kolorektal Herediter berdasarkan APC dan MSH bermakna pada usia dan staging. Skoring factor: $y = -1,789 + 2,140 \text{ usia} + 2,466 \text{ Staging}$. (Usia 1= <50 tahun ; 0= >50 tahun. Staging 1= C dan D; 0=A dan B)

D.4 Herediter Berdasarkan APC dan MSH (Step 1)

Contoh Perhitungan probabilitas pada semua skenario subjek

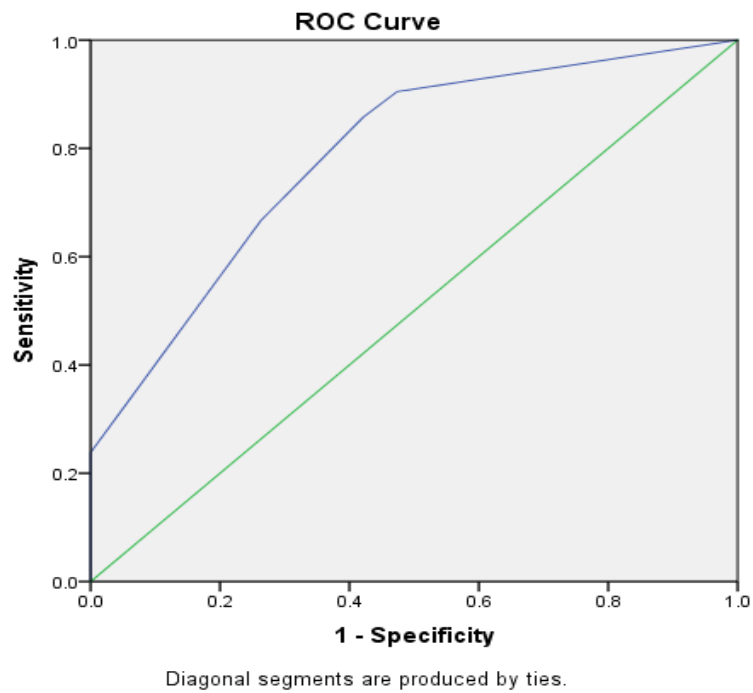
Tabel 13 Contoh Perhitungan Probabilitas pada Semua Skenario Subjek

Skenario	Usia	Staging	Riwayat	y	p
1	1	1	1	2,890	0,947
2	1	1	0	2,447	0,920
3	1	0	1	0,443	0,609
4	1	0	0	0,000	0,500
5	0	1	1	1,114	0,753
6	0	1	0	0,671	0,662
7	0	0	1	-1,333	0,209
8	0	0	0	-1,776	0,145

$y = -1,776 + 1,776 \text{ usia} + 2,447 \text{ Staging} + 0,443 \text{ riwayat}$	$P = 1/(1+\exp[-y])$
Usia (1= <50 tahun ; 0= >50 tahun)	Staging (1= C dan D; 0=A dan B)
Riwayat (1=Ya ; 2=Tidak)	

Hosmer and Lameshow test ($p=0,943$)

Nilai AUC=0,787 (IK 95% 0,646-0,928)



Gambar 26. Kurva ROC Nilai Probabilitas Hereditas Berdasarkan APC dan MSH Step 1

Tabel 14. Prevalensi Differensiasi pada Pasien Kanker Kolorektal

Variabel	Deskripsi (n=39)
Differensiasi	
Baik	26 (66,7)
Sedang	6 (15,4)
Buruk	7 (17,9)

Variabel kategorik disajikan dalam n (%)

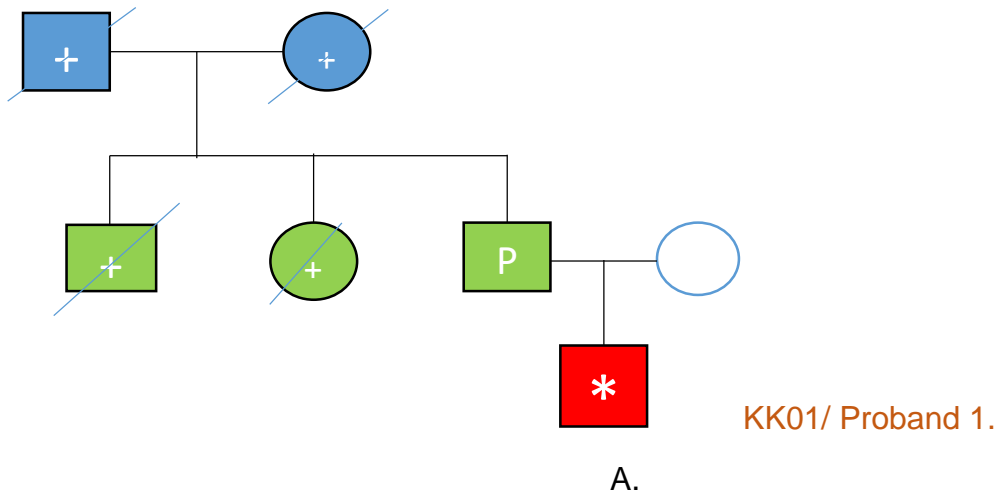
E. Analisa Pedigri Kanker kolorektal (KKR) Hereditas

Gambar 27. Analisa Pedigri pada pasien KKR

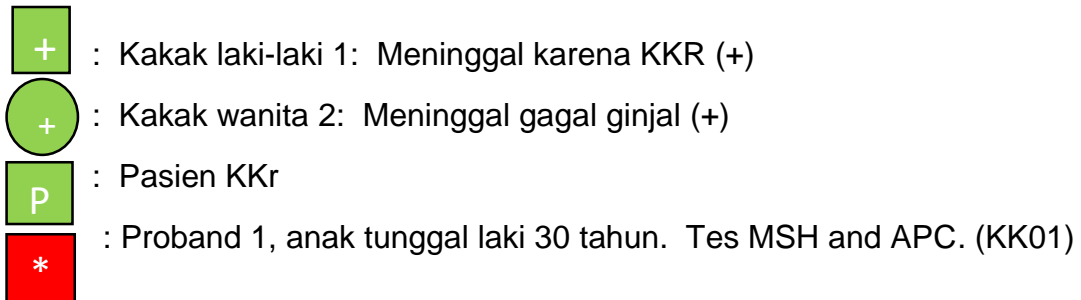
Catatan :



1. Tn. A 67 tahun (Pedigri)

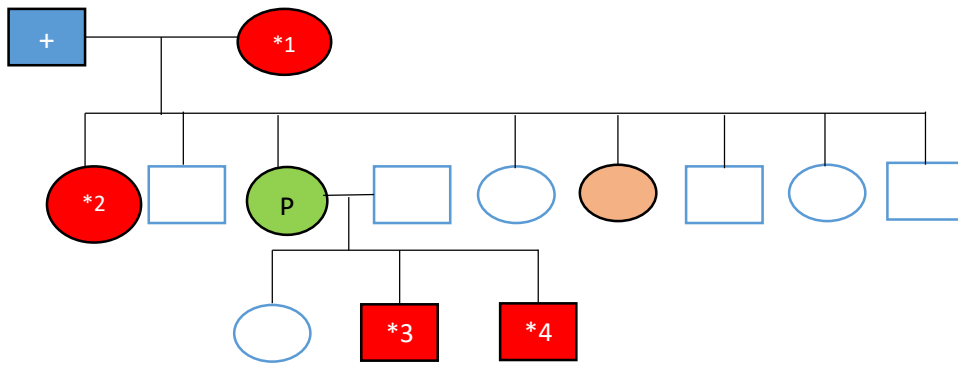


Keterangan:



2. Ny. A1 /44 tahun (Pedigri)





B.

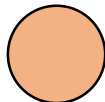
Keterangan:



: Ayah meninggal karena KKR (+)



: Pasien KKR



: Adik laki-laki (Kanker kulit)



: Ibu 74 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK02) Proband 2



: Kakak wanita 1. 49 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK03). Proband 3



: Anak laki-laki ke 2. 23 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK04)

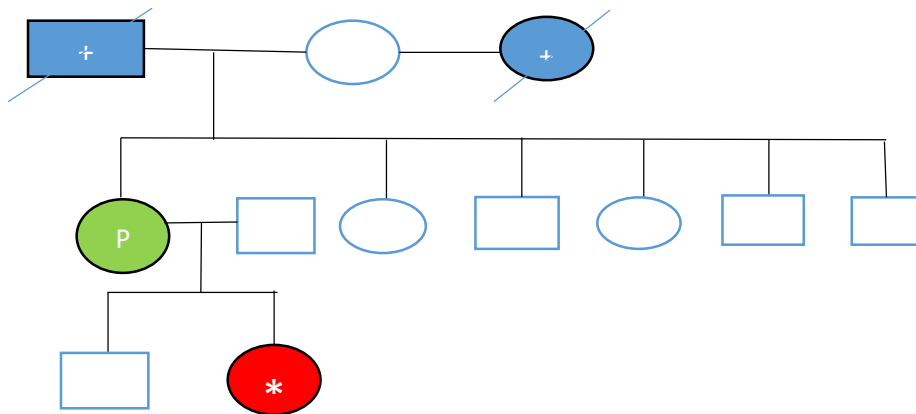
Proband 4.



: Anak laki-laki ke 3. 20 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK05) Proband





5

3. Ny. E /62 tahun (Pedigri)

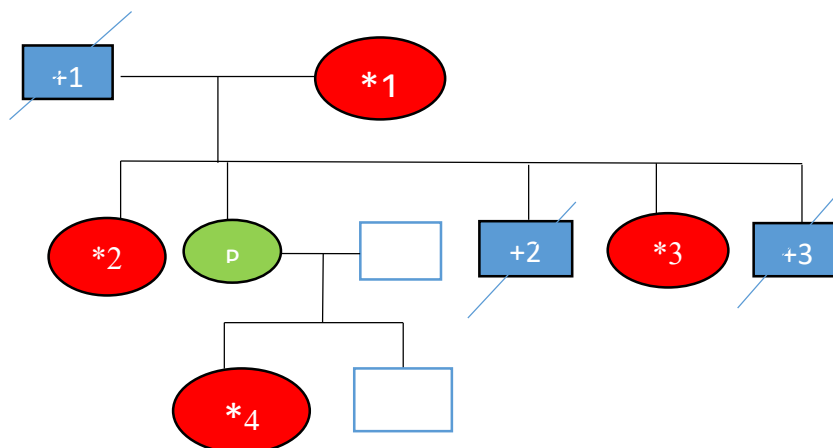


C

Keterangan:



-  : Ayah meninggal (+) (Penyebab tidak tahu)
-  : Bibi meninggal KKR (+)
-  : Pasien KKR
-  : Anak wanita ke 2. 43 tahun. Tes MSH APC herediter (KK06) Proband 6

4. Ny. A2/47 tahun (Pedigri)



D

Keterangan:

-  : Ayah meninggal kanker prostat (+)
-  : Ayah meninggal kanker prostat (+)

- : Adik laki-laki, 17 tahun. Meninggal kecelakaan lalu lintas (+)
 +3 : Adik laki-laki. 40 tahun. Meninggal serangan jantung.
 P : Pasien 47 tahun. KKR
 *1 : Ibu 64 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK07) . Proband 7
 *2 : Kakak wanita 52 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK08) Proban 8
 *3 : Adik wanita 45 tahun. Tes MSH dan APC (KK09) Proband 9
 *4 : Anak pertama. 28 tahun. Tes MSH dan APC herediter (KK10). Proband 10

Tabel 15. Analisa Bayesian Proband

Proband	Prior Hereditas Pedigri	Usia (tahun)	APC (fold change)	MSH2 (fold change)	Y	phi	yhat	
Proband 1	0.5	30	7290	9753	1	1	151.4142	
Proband 2	0	74	13832	14209	0	0.932104	2.619474	
Proband 3	0.5	49	8727	9567	1	0.50415	0.0166	
Proband 4	0.5	23	9757	10320	1	0.50516	0.020641	
Proband 5	0.5	20	14524	13073	0	0.500006	2.23E-05	
Proband 6	0.5	43	11676	10673	1	0.5	0	
Proband 7	0	64	14020	13653	0	0.5	0	
Proband 8	0.5	52	6884	7073	1	0.5	0	
Proband 9	0.5	45	14341	13295	0	0.5	0	
Proband 10	0.5	28	14609	13426	0	0.5	0	
			APC 12.195 MSH: 11.059. Cutoff Usia/tahun 50 tahun					

Analisa Bayesian pada *Proband*. Ekspresi pada Pohon keluarga (*Family Pedigree*) sebagai risiko awal herediter (*prio risk*), dimodifikasi informasi kondisi (*condition information*) dari usia dan analisa genomik (APC dan MSH2) menghasilkan probabilitas secara keseluruhan sebagai status karier pada kolom **phi**.

BAB VI

Pembahasan

6.1. Prevalensi KKR

Data penelitian KKR tahun 2000 menunjukkan 10-30 % pasien mempunyai riwayat keluarga menderita KKR herediter. Secara epidemiologi terdapat pergeseran usia dimana terjadi peningkatan KKR pada usia muda kurang dari 50 tahun dengan rerata usia 42,5 tahun. Penelitian NCHS (National Centre for Health Statistics). Antara tahun 2009 -2013 insidensi KKR pada usia ≥ 50 tahun menurun 5% setahun, namun meningkat 22% pada KKR usia muda (< 50 tahun). Sama halnya angka kematian pada KKR menurun 34% pada usia ≥ 50 tahun, dan meningkat 13% pada usia < 50 tahun.

Tidak terdapat perbedaan ras dan gender pada kedua kelompok usia. (American Cancer Society, 2020). Penelitian Siegel et al KKR pada Usia muda (20-49 tahun) meningkat 5,2% pada laki-laki dan 5,6% pada wanita. (Siegel et al, 2017). Prevalensi KKR usia muda tertinggi ditemukan di Mesir 35,6% dan Turki 19,4%. Sementara di USA atau UE antara 3,0% - 8,6%. KKR usia muda mempunyai riwayat keluarga dan yang positif genetik 15-30%. Sementara HNPCC dan FAP 15,5%. (Stigliano et al, 2014). Secara umum kasus familial terdapat \pm 30% dari KKR dan terdapat 5-10% mutasi gen herediter. Yang paling sering adalah HNPCC Lynch syndrome dan FAP serta variannya. (Jasperson KW et al, 2010; Kim ER & Kim YH. 2014).

Pada 40 subjek KKR yang diteliti usia rata-rata relatif muda yaitu $56,80 \pm 8,40$ tahun. Terdapat 30,5% (14/40) subjek KKR berusia \leq 50 tahun. Tidak terdapat perbedaan gender baik pada subjek KKR maupun kontrol. (Tabel 1).

Sampai saat ini belum terdapat referensi kriteria nilai herediter gen berdasarkan ekspresi mRNA APC maupun MSH2. Kriteria herediter pada subjek KKR yang diteliti yaitu nilai APC darah lebih rendah dari nilai titik potong APC 12.195,80 dan nilai MSH2 darah lebih rendah dari 11.059,60 (Fold Change). Subjek KKR menunjukkan herediter: APC 50%, MSH2 32,5% dan Gabungan APC dan MSH2 52%. (Tabel 6).

6.2. Faktor risiko KKR herediter, hubungan dengan klinis dan fenotipe

Faktor risiko KKR terbagi 2 jenis, yaitu: (1). Faktor yang dapat dimodifikasi yaitu: Obesitas, Aktifitas fisik (olah raga), diet daging termasuk daging olahan, kurangnya sayur dan serat, konsumsi alkohol, rokok, obat NSAID, terapi hormonal pada menopause, Vit D. (2). Faktor yang tidak dapat dimodifikasi yaitu usia, Inflammatory bowel disease (IBD) dan riwayat keturunan KKR. Pada meta-analisis tampak faktor riwayat keturunan KKR atau adenoma dan IBD kronis merupakan risiko yang paling tinggi untuk menderita KKR. (Johnson CM et al, 2013) (American Cancer Society, 2020)

Usia subjek pada kelompok herediter lebih muda dari pada non herediter baik berdasarkan APC, MSH dan gabungan, terutama lebih bermakna berdasarkan MSH2. (Tabel 7, 8, 9). Tidak terdapat subjek KKR dengan penyakit IBD pada penelitian ini.

Pada 40 subjek KKR terdapat 8 subjek (20%) yang mempunyai riwayat keluarga KKR. Pada subjek yang mempunyai riwayat keluarga dengan kriteria nilai titik potong APC 12.195,80 dan MSH2 11.059,60 semuanya sesuai herediter. Terdapat 1 subjek yang mempunyai nilai APC darah normal namun MSH2 menunjukkan kriteria herediter. Pada semua subjek KKR yang diteliti dengan nilai titik potong mRNA terdapat prevalensi herediter lebih tinggi dari pada yang mempunyai riwayat herediter KKR. (Tabel 6). Hal ini menunjukkan lebih banyak KKR herediter yang tersembunyi selain riwayat keluarga yang positif.

Analisa subjek KKR yang diteliti mempunyai kemaknaan hubungan dengan herediter adalah: staging, usia dan riwayat keluarga. (Tabel 10, Tabel 11, Tabel 12)

Letak tumor pada KKR usia muda lebih banyak terletak di kolon distal dan rectum (55-80%). Klinis KKR HNPCC berupa polip datar, kecil pada kolon proksimal dengan gambaran PA diferensiasi buruk yang sebagian mempunyai sel signet ring bermucin. (Lynch HT et al. 1088; Watson P et al. 1994). Namun pada penelitian Stigliano gambaran klasik letak tumor HNPCC pada kolon sebelah kanan tidak sering ditemukan pada KKR usia muda. (Stigliano V et al 2014).

Pada subjek yang diteliti (usia relatif muda) letak tumor terbanyak juga terdapat pada kolon distal 70% (28/40). KKR herediter berdasarkan MSH2 letak tumor lebih banyak diproksimal sesuai dengan HNPCC. (Tabel 8). Namun pada analisa subjek KKR secara keseluruhan tidak terdapat hubungan yang bermakna antara letak tumor dengan parameter herediter berdasarkan APC, MSH2 maupun gabungan APC dan MSH2 (Tab 7, Tab 8 dan Tab 9).

Gambaran histopatologi pada penelitian Stigliano dkk pada KKR usia muda umumnya menunjukkan diferensiasi buruk dan musinosum 9-49% dibanding 17% pada populasi KKR umumnya. Sarjana lain histopatologi KKR diferensiasi buruk pada usia muda 12-98% dibanding 15% populasi KKR umumnya. Diduga KKR pada usia muda lebih agresif berdasarkan gambaran PA. (Stigliano V et al 2014).

Pada subjek yang diteliti gambaran PA terbanyak adalah Adenokarsinoma berdiferensiasi baik, diikuti berdiferensiasi buruk dan berdiferensiasi sedang. Terdapat 3 subjek dengan Signet ring sel / mucinosum KKR dan 1 Neuroendokrinsinoma.

Pada kasus dengan Signet ring sel 2 subjek mempunyai nilai APC dan MSH yang rendah dan 1 subjek mempunyai nilai APC dan MSH normal. Tidak dapat disimpulkan bahwa signet ring sel / musinosum merupakan prediksi herediter. Karena hal ini dapat terjadi pada KKR herediter maupun KKR sporadik hMSH.

Pada subjek KKR yang diteliti tidak terdapat hubungan yang bermakna antara bentuk P.A. dan kondisi herediter baik berdasarkan APC, MSH2 maupun nilai Gabungan APC dan MSH2. (Tabel 7, 8, 9) Histologi Patologi Anatomi dengan pemeriksaan IHK secara tidak langsung dapat menggambarkan herediter KKR pada HNPCC, namun hal ini memerlukan ketrampilan dan teknik khusus. Pada subjek yang diteliti tidak dilakukan pemeriksaan IHK, namun dilakukan pemeriksaan mRNA sebagai kriteria risiko KKR herediter.

Stadium penyakit pada KKR Usia muda umumnya ditemukan stadium lanjut (Duke C atau D) 71-80 % (Stigliano V et al 2014). Pada subjek yang diteliti kelompok herediter ditemukan lebih banyak adalah stadium lanjut, sedangkan yang nonherediter ditemukan lebih banyak stadium lebih awal dengan perbedaan yang bermakna (Tab 7, 8, 9) terutama terhadap APC dan nilai gabungan APC dan MSH. Disimpulkan bahwa pada pasien dengan herediter lebih agresif dari yang non herediter.

Bentuk tumor yang dinilai secara kolonoskopi pada subjek KKR semuanya berupa *advance protruded* dan sebagian *sircumscribe* yang menutupi lumen kolon sehingga sulit untuk mengklasifikasi derajat KKR dan sifat herediter berdasarkan bentuk tumor.

6.3. KKR herediter HNPCC dan FAP.

6.3.1. KKR herediter HNPCC

Secara klasik untuk menentukan diagnosis klinis KKR herediter HNPCC diperlukan kriteria Amsterdam dan Bethesda sebagai berikut:

Kriteria **Amsterdam I** 1990, yaitu setelah disingkirkan adanya FAP, maka (1). Tiga atau lebih anggota keluarga secara histologi dibuktikan KKR, salah satunya terdapat hubungan keluarga langsung. (2). KKR mencakup minimal 2 generasi. (3). Satu atau lebih KKR didiagnosis sebelum usia 50 tahun. Kriteria ini terlalu ketat terutama untuk keluarga kecil dan gagal mengenal manifestasi tumor di luar kolon, maka pada tahun 1999 dilakukan revisi **Amsterdam II** yang melibatkan kanker lain yang berhubungan dengan HNPCC, namun kriteria ini juga terlampau sempit sehingga kehilangan 1/3 anak dengan mutasi MMR. (Vasen HF et al. 1999; Salovaara R et al. 2000).

Kriteria **Bethesda** 1997 untuk Sindroma Lynch adalah sebagai berikut:

- KKR didagnosis pada usia < 50 tahun
- Terdapat sinkronos atau metakronos tumor tidak tergantung usia.
- Histologi KKR dengan MSI-H pada usia < 60 tahun
- Diagnosis KKR pada pasien dengan 1 atau lebih keturunan pertama sindroma Lynch, dengan 1 dari kanker didiagnosis pada usia < 50 tahun.

- KKR didiagnosis pada pasien dengan 2 atau lebih keturunan derajat 1 atau 2 dengan sindroma Lynch tidak tergantung usia. (Burt RW et al. 2010)

Hal ini menjadi sulit jika terdapat salah satu kriteria tidak terpenuhi. Penelitian Stigliano dengan menggunakan kriteria Amsterdam hanya didapatkan 1 dari 180 KKR usia muda yang terdiagnosa sebagai HNPCC. (Stigliano V et al, 2014)

Dari 8 subjek KKR yang diteliti dengan riwayat keturunan KKR dan 4 subjek yang bersedia dilakukan analisa pedigri tidak ada yang masuk kriteria Amsterdam maupun Bethesda. Namun pada seluruh subjek yang diteliti melalui pemeriksaan APC dan MSH2 darah dan jaringan didapatkan 32,5 % KKR herediter berdasarkan MSH2 dan 52,5% berdasarkan gabungan APC dan MSH2 (Tabel 5 dan Tabel 6). Pada evaluasi tidak terdapat subjek dengan tumor diluar KKR.

Lynch syndrome adalah autosomal dominan dengan mutasi pada 4 gen MMR, MSH2, MLH1, MLH3, MSH6, MSH3, MSH5 dan PMS2 dll. Mutasi yang terbanyak terjadi pada MLH1 dan MSH2 (90%). hMSH6 10%, kadang-kadang hPMS2 terutama pada HNPCC usia tua (70 tahun) dan EpCAM. (Japerson KW et al, 2010 ; Kim ER & Kim YH, 2014). 10 – 15 % KKR sporadik menunjukkan kelainan metilasi gen promotor MLH1, sehingga adanya kelainan MLH pada tes IHC tidak dapat diagnosis sebagai KKR herediter. (Burt RW et al 2010). Demikian pula gen *BRAF* (V600E) adalah mutasi umum yang mempromosi hipermetilasi MLH1 sebagai petunjuk KKR sporadik dengan MSI (Liu Q & Tan YQ, 2019).

Pada subjek yang diteliti tidak dilakukan pemeriksaan MLH1, karena nilai MLH1 yang rendah sulit untuk membedakan sporadik dengan herediter.

6.3.2. Kanker Kolorektal Familial Adenoma Poliposis (FAP)

KKR jenis FAP biasanya asimtomatik sampai pubertas ketika poliposis adenoma kolorektal mulai terjadi, biasanya pada usia 25 tahun. KKR FAP simtomatik rata-rata pada usia 48 tahun. Poliposis berupa sejumlah polip kecil sampai seluruh kolon terbentuk polip yang secara histologi mirip polip sporadik berupa tubular, tubulovilosa atau glandular vilosa. (Debiski HS et al.1996). (Gambar 16) Tumor diluar kolon (Glioma otak, Tiroid, Bilier, Hati, GI bagian atas, adrenal, osteoma (sindroma

Gardner), CHRPE, fibroma / desmoid tumor mesenterim), PJS, JPS sering tidak dipikirkan korelasinya dengan mutasi APC pada FAP.

Pada subjek KKR yang diteliti sulit menentukan KKR FAP pada stadium lanjut karena polip sudah menjadi massa tumor besar yang sama dengan KKR umumnya dan sebagian menyebabkan lumen kolon striktur sehingga alat endoskopi tidak dapat dilanjutkan lebih ke proksimal untuk menilai poliposis. Pada subjek yang diteliti melalui pemeriksaan APC darah didapatkan KKR herediter sebanyak 50% dan berdasarkan gabungan APC dan MSH2 didapatkan 52 % sebagai KKR herediter. (Tabel 5 dan Tabel 6)

6.4. Tes Genetika KKR Herediter

Pentingnya tes Genetika untuk diagnosis karena kurangnya karakteristik fenotipe pada KKR herediter. Pada kasus keluarga dengan positif kriteria Amsterdam hanya ditemukan 49% mutasi. Diluar kriteria Amsterdam, keturunan KKR hanya ditemukan 8 % yang ditemukan mutasi. Umumnya pemeriksaan MSI dilakukan terhadap protein truncation dan sekuensing pada DNA blok tumor sebelum dilakukan pada darah perifer. (Burt RW;2000). Genomik sekuensing mulai tampak pengaruhnya untuk memastikan diagnosis FAP. Generasi baru sekuensing dengan panel multigen untuk beberapa penyakit keturunan pada pasien dengan riwayat keturunan yang meragukan serta anggota keluarga yang berisiko. (Esplinn ED & Snyder MP, 2014)

Gen APC dan MSH merupakan gen yang sangat besar dengan variasi hot spot yang berbeda-beda untuk setiap kelainan FAP dan HNPCC. Kebanyakan mutasi didasarkan pada sekuensing DNA. Untuk melakukan sekuensing DNA diperlukan sampel gen yang sangat panjang dari APC maupun MSH2, sedangkan hot spot berbeda-beda pada daftar pustaka yang ada. Sekuensing DNA yang pernah kami lakukan terhadap 30 kasus KKR hanya didapatkan 1 polimorfisme, sehingga menurut peneliti untuk sekuensing DNA lebih rumit dan diperlukan *whole genom sequence* dengan biaya yang sangat besar untuk mendiagnosis KKR herediter.

Real Time PCR (RT-PCR) adalah teknik yang digunakan untuk monitor progress PCR pada waktu yang sama. RT-PCR dikenal juga sebagai quantitative PCR (qPCR). Jumlah produk PCR (DNA, cDNA, RNA) yang relatif sedikit dapat dihitung secara

kuantitatif. RT-PCR memiliki sensitifitas dan spesifisitas tinggi. RT-PCR diperlukan untuk penilaian RNA yang kurang stabil dibandingkan DNA. Kuantitas mRNA dalam sel merupakan parameter jumlah gen yang terekspresi. Analisa hasil RT-PCR dapat dilakukan secara *absolute quantification* dan *relative quantification* dengan menggunakan *housekeeping gene* sebagai gen referensi. Pada RT-PCR deteksi produk PCR dapat dihasilkan sejak fase awal reaksi, sedangkan PCR biasa hanya menggunakan elektroforesis gel untuk deteksi produk amplifikasi pada fase akhir, tanpa mengetahui jumlah produk PCR yang diekspresi. (Hatta M et al, 2017)

Pemeriksaan PCR mRNA APC dan MSH2 kuantitatif pada subjek KKR yang diteliti terdapat perbedaan bermakna baik antara jaringan tumor dan darah pada subjek KKR (Tabel 4a), maupun pada darah antara subjek KKR dan subjek kontrol. (Tabel 4 b).

Sejauh ini tidak terdapat referensi nilai titik potong kuantitatif ekspresi mRNA APC maupun MSH2. Pada 30 subjek kontrol yang diteliti didapatkan titik potong herediter ekspresi mRNA kuantitatif APC 5th persentil adalah 12.195 Fold-change dan MSH2 11.059 Fold-change (Tabel 2, Tabel 3).

6.5. Herediter dan riwayat keluarga.

30% pasien KKR mempunyai riwayat herediter, yang merupakan salah satu hal penting dalam faktor risiko. Orang dengan riwayat herediter KKR generasi pertama (orang tua, saudara kandung, atau anak) mempunyai risiko 2-4 kali mendapat penyakit yang sama dibandingkan tanpa riwayat keluarga. Risiko lebih tinggi sebagai KKR herediter pada usia < 50 tahun atau adanya riwayat beberapa anggota keluarga yang terdampak. Risiko KKR pada keluarga dengan polip juga meningkat. Banyak kelompok keluarga dengan KKR ternyata merupakan interaksi dari variasi genetik dengan prevalensi yang tinggi dan penetrasi yang rendah. Insidensi KKR herediter yang rendah karena sampai saat ini catatan medical record pada keluarga pasien masih rendah. Catatan pada medical record hanya didapatkan 22% informasi riwayat keluarga. Hal yang sebenarnya penting untuk konseling dan tes genetik. Mengetahui risiko tinggi pada proband penting untuk mengurangi angka kejadian KKR berulang dan angka kematian

seperti melakukan polipektomi dan preventif khemo seperti menggunakan NSAID aspirin. (American Cancer Society,2020).

Pada anamnesis subjek yang diteliti terdapat 8 (20%) mempunyai riwayat KKR herediter. Dengan menilai titik potong mRNA didapatkan nilai prevalensi herediter yang lebih tinggi, yaitu: berdasarkan APC: 50% (20/40), MSH2: 32,5% (13/40) dan berdasarkan gabungan didapatkan herediter KKR 52,5% (21/40). (Tabel 3, Tabel 5, Tabel 6)

6.6. Hubungan KKR dengan faktor risiko KKR herediter :

Pada meta-analisis Johnson dkk, didapatkan faktor risiko pada KKR yang bermakna adalah IBD (Inflamatory Bowel Disease) (RR=2,93, 95% CI: 1,79-4,81) dan Riwayat keturunan pertama KKR (RR=1,79, 95 CI 1,60-2,02) serta faktor usia yang merupakan faktor yang tidak dapat dimodifikasi. Sedangkan faktor risiko lain yang kurang bermakna adalah kenaikan IMT (Indeks Massa Tubuh), kurang aktifitas fisik, merokok, konsumsi daging merah dan daging olahan, konsumsi alcohol, kurangnya diet sayur dan buah-buahan, konsumsi obat aspirin, NSAID dan terapi hormonal. (Johnson CM et al, 2013)

Beberapa ahli menyimpulkan KKR pada usia muda lebih agresif dengan prognosis yang masih bertentangan. Penilaian prediksi yang paling konsisten terhadap beratnya penyakit adalah riwayat jumlah keturunan anggota keluarga yang mengalami KKR dan usia saat diagnosis. (Burt RW, 2000). Pada meta-analisa lain APC hypermetilasi tidak berhubungan dengan derajat, stadium, letak tumor, gender dan merokok. Juga tidak berhubungan dengan kesintasan KKR. (Tie-Jun Liang TJ et al, 2017).

Analisa multivariate digunakan untuk menilai kemaknaan hubungan dengan menggunakan Regresi logistik pada variabel tergantung berskala nominal (Herediter–Nonherediter) dan Variabel bebas berupa variabel prediktor berskala numerik dan katagorik. Dilakukan kurva persamaan regresi logistik untuk menilai ROC. Untuk Variabel perancu dilakukan eliminasi subjek.

Model log dari Odds merupakan fungsi linear dari variabel bebas dengan log dari Odds sebagai variable terikat. P: Peluang efek. $X_1 - X_i$: Variable predictor. a: Konstanta. b

$1 - b_i$: Koefisien regresi. Menilai Model Fit dengan kemaknaan pada alfa 5% dilakukan melalui *Hosmer dan Lemeshow's Goodness of Fit Test* yang lebih besar dari 0,05 (hipotesis nol tidak dapat ditolak) berarti model dapat memprediksi nilai observasinya atau model dapat diterima karena cocok dengan data observasi.

Pada analisa subjek yang diteliti hubungan yang bermakna sebagai herediter berdasarkan APC, MSH2 dan Gabungan APC dan MSH2 adalah sebagai berikut:

Pada subjek penelitian univarian baik pada Gen APC, MSH2 maupun gabungan APC dan MSH2 tidak terdapat hubungan (peluang) herediter dengan gender, letak tumor maupun diferensiasi histopatologi. (Tabel 7, Tabel 8 dan Tabel 9).

Analisa multivarian Regresi Logistik Faktor Resiko KKR Herediter berdasarkan APC menunjukkan hubungan yang bermakna pada **staging dan usia** dengan skoring $y = -1,855 + 1,800 \text{ usia} + 2,562 \text{ Staging}$. (Usia 1= <50 tahun ; 0= >50 tahun. Staging 1= C dan D; 0=A dan B).

Analisa multivarian Regresi Logistik Faktor Risiko KKR Herediter berdasarkan MSH2 hubungan yang bermakna pada **staging dan riwayat** dengan Skoring $y = -3,165 + 2,395 \text{ Staging} + 3,126 \text{ Riwayat}$. (Riwayat 1= Ya ; 0= Tidak, Staging 1= C dan D; 0=A dan B)

Multivarian uji Regresi Logistik Faktor Resiko KKR Herediter berdasarkan gabungan APC dan MSH hubungan yang bermakna pada **usia dan staging**. Skoring faktor: $y = -1,789 + 2,140 \text{ usia} + 2,466 \text{ Staging}$. (Usia 1= <50 tahun; 0= >50 tahun. Staging 1= C dan D; 0=A dan B)

Interpretasi pada tahap awal: APC dan MSH2: Usia, Staging, dan riwayat didapatkan skoring: $Y = 1,776 + 1,776 \text{ Usia} + 2,447 \text{ staging} + 0,443 \text{ Riwayat}$.

Kurve ROC pada semua model uji regresi adalah Fit dengan kemaknaan alfa 5% (melalui *Hosmer dan Lemeshow's Goodness of Fit Test* > 0,05). Hal ini menunjukkan model dapat memprediksi nilai observasinya atau model dapat diterima karena cocok dengan data observasi. (Tabel 10, Tabel 11, Tabel 12, Gambar 23, Gambar 24, Gambar 25)

Untuk menilai risiko KKR herediter pada keluarga (proband) secara langsung diperlukan cara analisa lain probabilitas KKR herediter.

6.7. Analisa Pedigri Kankerkolorektal (KKR) Herediter

Banyak manifestasi KKR autosomal dominan terjadi pada usia lanjut diatas usia reproduktif. Saat ini deteksi mutasi gen langsung pada keluarga pasien menjadi standar. Sampel DNA atau RNA bisa didapatkan dari jaringan tumor, kikisan (*swab*) buccal mulut, sampel darah, amniosentesis dll (Nussbaum RL et al. Risk Assessment and Genetic Counseling, 2016). Pada subjek yang diperiksa sampel diambil dari jaringan tumor saat endoskopi atau operasi dan sampel darah diambil dari subjek KKR, subjek kontrol dan proband. Derajat risiko anggota keluarga dengan riwayat KKR tergantung dari jumlah anggota keluarga yang menderita kanker, dekatnya hubungan dengan subjek KKR, serta usia anggota keluarga yang terdampak. Secara klinisi data empirik epidemiologi berperan terhadap rata-rata risiko KKR. (Turnpenny PD & Ellard S. The Genetics of Cancer and Cancer Genetics, 2017).

Riwayat keluarga yang akurat merupakan hal penting dan sangat relevan dalam menentukan risiko KKR. Kombinasi riwayat keluarga dan genomik yang mutakhir sangat berguna untuk diagnosis dan terapi dan pencegahan kanker umumnya. Secara substansi riwayat keluarga dapat mengubah nilai prediksi dari tes genetik. Bentuk yang paling jelas adalah menyajikan dan interpretasi riwayat keluarga melalui gambaran pohon keluarga (*family pedigree*). Tiga generasi pedigri dari keluarga pasien adalah bentuk status kesehatan silsilah keluarga yang diperlukan. Gambaran silsilah ini secara jelas dan mudah menggambarkan hubungan dengan herediter KKR. (Guttmacher AE, Collins FS & Carmona RH, 2004; Brock JAK et al, 2016).

Pada kelainan herediter autosomal dominan penting dipertimbangkan faktor-faktor yang mengurangi *penetrance* dan usia. Penilaian risiko KKR pada anggota keluarga membutuhkan pertimbangan yang cermat, serta memperhitungkan hal-hal berikut: (1). Bentuk keturunan (Autosomal dominant, Autosomal recessive, X-linked dominant, X-linked recessive dan mitochondrial) serta data epidemiologi yang berhubungan dengan riwayat alamiah penyakit (*age of onset*). (2). Analisa pohon keluarga (Family pedigree). (3). Rekam tautan (*linkage study*) menggunakan marker DNA atau analisa mutasi positif dan negatif. (Nussbaum RL et al, Risk Assessment and Genetic

Counseling, 2016; Turnpenny PD & Ellard S. Risk Calculation, 2017; Chin L et al, 2011)

Teori Bayesien menggabungkan risiko awal (*prior risk*) dari pedigri, dimodifikasi oleh informasi kondisi (*condition information*) dari usia, ekspresi Gen APC dan ekspresi gen MSH2 yang akan memberikan probabilitas secara keseluruhan dari risiko status karier.

Analisa Bayesien pada 4 keluarga subjek KKR dengan 10 proband dilakukan evaluasi risiko berulang (*recurrence risk*) dari KKR melalui pedigri, usia, ekspresi APC dan ekspresi MSH2, pada Gambar 27 (A, B, C dan D) dan Tabel 15 mengacu pada nilai **Y dan phi** didapatkan sebagai berikut:

1. Pasien A, laki-laki 67 tahun, mendapatkan KKR herediter pada usia lanjut. Subjek memiliki keluarga kecil dengan hanya 1 anak laki-laki usia 30 tahun sebagai (Proband 1). Dari riwayat keturunan pedigri, usia, ekspresi APC dan MSH2 menunjukkan hampir 100 % mempunyai risiko KKR herediter.
2. Pasien A1 (Gambar B). Wanita usia 44 tahun, menderita KKR pada usia muda. Pasien memiliki riwayat ayah meninggal karena KKR. Namun ibu pasien (74 tahun (Proband 2), 93 % tidak memiliki risiko KKR herediter. Kakak wanita (Proband 3), usia 49 tahun, mempunyai risiko 50,41 % mendapatkan KKR herediter. Anak kedua, laki-laki, usia 23 tahun (Proband 4), memiliki 50,51% risiko KKR herediter. Anak ketiga (Proband 5), laki-laki usia 20 tahun, 50% tidak memiliki KKR herediter karena nilai yang ekspresi RNA APC dan MSH2 yang tinggi.
3. Pasien E (Gambar 1 C), wanita 62 tahun dengan keluarga besar, namun hanya 1 anak wanita (Proband 6), 43 tahun yang dapat dievaluasi. Ayah pasien meninggal tidak diketahui penyebabnya, namun bibi nya meninggal karena KKR. Proband 6 mempunyai risiko 50% sebagai KKR herediter.
4. Pasien A2, wanita usia 47 tahun (Gambar D). Pasien menderita KKR pada usia muda dan mempunyai riwayat ayah meninggal karena kanker prostat. Ibu pasien (Proband 7), 64 tahun mempunyai risiko 50% untuk tidak mendapat KKR herediter. Kakak wanita (Proband 8), 52 tahun mempunyai 50% risiko berulang (*recurrence risk*) KKR herediter. Adik perempuan (Proband 9), usia

45 tahun, mempunyai risiko 50% untuk tidak menderita KKR herediter. Anak pertama, wanita (Proband 10), usia 28 tahun jg mempunyai risiko 50% untuk tidak mendapatkan KKR herediter.

Analisa akhir probabilitas Proband dengan Titik potong APC: 12.195 Fold change dan MSH2 11.059 Fold change, Usia 50 tahun, dan Riwayat keturunan menunjukkan: Proband 1, 100% mempunyai risiko herediter KKR. Proband 2, 93% mempunyai risiko untuk tidak mendapat KKR herediter. Proband 3, 50% mempunyai risiko KKR herediter. Proband 4, 50% mempunyai risiko KKR Herediter. Proband 5, mempunyai risiko 50% untuk tidak mendapat KKR herediter. Proband 6, mempunyai risiko 50% mempunyai risiko KKR herediter. Proband 7, mempunyai risiko 50% untuk tidak mandapatkan KKR herediter. Proband 8, mempunyai risiko 50%mendapatkan KKR herediter. Proband 9, mempunyai risiko 50% untuk tidak mempunyai risiko KKR herediter. Proband 10. Mempunyai risiko 50 % untuk tidak mempunyai risiko KKR herediter.

Kesimpulan yang mempunyai risiko KKR herediter menggunakan analisa Bayesien terdapat pada Proband 1, 3, 4, 6, 8. (Tabel 15).

Kelemahan penelitian

1. Tidak semua gen herediter disertakan dalam penelitian
2. Tidak semua subjek KKR yang mempunyai riwayat keturunan KKR dapat dievaluasi pedigree dan probabilitas herediternya.

Kesimpulan

1. Ekspresi mRNA gen APC dan gen MSH2 dapat digunakan sebagai parameter herediter pada kanker kolorektal.
2. Nilai titik potong ekspresi mRNA gen herediter APC didapatkan 12.195,80 Fold Change dan gen herediter MSH2 adalah 11.095,60 Fold Change.
3. Terdapat ekspresi yang rendah gen APC dan MSH2 jaringan dan darah pada subjek KKR sebagai parameter herediter. (Berdasarkan APC: 50%, MSH2:32,5%, Gabungan APC dan MSH2: 52,5%.)
4. Nilai ekspresi APC dan MSH2 berhubungan secara bermakna dengan staging, riwayat dan Usia KKR.
5. Ekspresi kuantitatif realtime mRNA gen APC dan MSH2 dapat memprediksi kanker berulang pada keluarga (Proband).

6. Analisa Bayesian dapat digunakan untuk menilai probabilitas KKR berulang pada anggota keluarga subjek KKR.

Saran:

1. Pemeriksaan ekspresi mRNA APC dan MSH2 dilakukan pada subjek KKR dan pada seluruh anggota keluarga (Proband) jika nilai ekspresinya rendah serta dan mempunyai riwayat keturunan KKR.
2. Penelitian dilanjutkan dengan melibatkan lebih banyak gen herediter KKR.
3. Ekspresi mRNA dilakukan validasi dengan data sekuensing pada subjek KKR.

DAFTAR PUSTAKA

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-6.

Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. 1994. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54: 1645.

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. 1998. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338: 1481.

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. 1999. Cancer risk in mutation carriers of DNA mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81: 214.

Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, et al. 2008. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med* 149: 441-50.

Akhurst RJ, Balmain A. 1999. Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. *J Pathol* 187: 82.

Aktas H, Cai H, Cooper GM. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 17 :3850.

Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. 2002. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30: 227-32.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26 :1626-34.

American Cancer Society: Cancer Fact and Figures 2020. Atlanta, Ga: American Cancer Society,2020. January 17,2020).

Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350 :2343-51.

Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. 2008. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 29:992-1006.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, and Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins,

immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50: 197–263.

Arber N, Eagle CJ, Spicak J, et al. 2006. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med* 355: 885-95.

Backlund MG, Mann JR, Holla VR, et al. 2005. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* 280:3217-23.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-21.

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249:912-5.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. 1990. p53 Gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50:7717-22.

Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, et al. 2008. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res* 68: 8541-6.

Barber TD, McManus K, Yuen KW, et al. 2008. Chromatoid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3443-8.

Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. 2003. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348:891-9.

Baughman Jr FA, List CF, Williams JR, et al. 1969. The glioma-polyposis syndrome. *N Engl J Med* 281:1345.

Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. 2000. Aberrant methylation of gene promoters in cancer: concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst* 92:1460.

Beacham CH, Shields HM, Raffensperger EC, Enterline HT. 1978. Juvenile and adenomatous gastrointestinal polyposis. *Am J Dig Dis* 23:1137

Belliveau P, Graham AM. 1984. Mesenteric desmoid tumor in Gardner's syndrome treated by sulindac. *Dis Colon Rectum* 27:53.

Bennett RL, French KS, Resta RG, Doyle DL. Standardized Human Pedigree Nomenclature: Update and Assessment of the Recommendations of the National

Society of Genetic Counselor. *J Genet Counsel* 2008; 17: 424-33. doi: 10.1007/s10897-008-9169-9.

Bergers G, Hanahan D, Coussens LM. 1998. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 995–1002.

Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, et al. 2006. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med* 355:873-84.

Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, et al. 2009. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 27: 1814-21.

Bertagnolli MM, Warren RS, Niedzwiecki D, et al. 2009. p27Kip1 in stage III colon cancer: implications for outcome following adjuvant chemotherapy in Cancer and Leukemia Group B protocol 89803. *Clin Cancer Res* 15:2116-22.

Bertario L, Russo A, Radice P, et al. 2000. Genotype and phenotype factors as determinants for rectal stump cancer in patients with familial adenomatous polyposis. *Hereditary Colorectal Tumors Registry. Ann Surg* 231:538.

Biesecker LG, Green RC. Diagnostic Clinical Genome and exome Sequencing. *N Engl J Med.* 2014 Jun 19;370(25):2418-25. doi: 10.1056/NEJMra1312543.

Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, et al. 1994. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 3:121.

Bjork J, Akerbrant H, Iselius L, et al. 2001. Periampullary adenomas and adenocarcinomas in familial adenomatous polyposis: cumulative risks and APC gene mutations. *Gastroenterology* 121:1127.

Blair NP, Trempe CL. 1980. Hypertrophy of the retinal pigment epithelium associated with Gardner's syndrome. *Am J Ophthalmol* 90:661.

Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. 2008. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 7:41-52.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. 1998. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248.

Boland CR. 1997. Genetic pathways to colorectal cancer. *Hosp Pract (Off Ed)* 32:79.

Boman BM, Huang E. 2008. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 26:2828-38.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. 1987. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327:293-7.

Bougatef K, Ouerhani S, Moussa A, Kourda N, Coulet F, Colas C et al. 2008. Prevalence of mutation in APC, CTNNB1 and BRAF in Tunisian patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Genetic and Cytogenetic* 187: 12-8.

Brock JAK, Allen VM, Kieser K, Langlois S. Family History Screening: Use of Three Generation Pedigree in Clinical Practice. *J Obstet Gynaecol Can* 2010;32(7): 663-72. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)34570-4](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)34570-4)

Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, et al. 2007. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 39:1315-7.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368:258-61.

Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello M. *Surg Clin North Am.* 2015;95(5); 1067-80). Doi: 10.1016/j.suc.2015.05.004.

Buckingham L. Molecular Detection of Inherited Diseases. In: Buckingham L, Flaws M. *Molecular Diagnostic. Fundamental , Methods, & Clinical Applications.* F.A. Davis Company 4th eds. Philadelphia 2011; 310-331. ISBN-13: 978-0803668294 ISBN-10: 0803668295 www.amazon.com DOI: <https://doi.org/10.29074/ascls.21.3.184>

Bulow S, Sondergaard JO, Witt I, et al. 1984. Mandibular osteomas in familial polyposis coli. *Dis Colon Rectum* 27:105.

Burdick D, Prior JT. 1982. Peutz-Jeghers syndrome: a clinicopathologic study of a large family with a 27-year follow-up. *Cancer* 50:2139.

Burn J, Chapman P, Delhanty J, et al. 1991. The UK Northern region genetic register for familial adenomatous polyposis coli: use of age of onset, congenital

hypertrophy of the retinal pigment epithelium, and DNA markers in risk calculations. *J Med Genet* 28:289.

Burt R et al. 1995. Genetic of Colon Cancer: Impact of inheritance on colon cancer risk. *Ann Rev Med* 46: 371-9.

Burt RW, Barthel JS, Dunn KB, David DS, Drelichman E, Ford JM et al. Colon Cancer Screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2010;8(1): 8-56.

Burt RW. Colon Cancer Screening. *Gastroenterology* 2000;119:837-53. Doi:10.1053/gast.2000.16508 Burt RW. Colon Cancer Screening. *Gastroenterology* 2000;119:837-53. Doi:10.1053/gast.2000.16508

Bussey H. 1975. Familial polyposis coli. Baltimore: Johns Hopkins Press

Bussey HJ, Veale AM, Morson BC. 1978. Genetics of gastrointestinal polyposis. *Gastroenterology* 74:1325.

Byers T. 1997. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer. *CA Cancer J Clin* 47: 154-60.

Cannon-Albright L, Skolnick M, Bishop T, Lee R, Burt R. 1988. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med* 319:533-7.

Cha YI, DuBois RN. 2007. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 58:239-52.

Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. 2007. Aspirin use and risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 356:2131-42.

Chen WD, Han ZJ, Skoletsy J, et al. 2005. Detection in fecal DNA of colon cancerspecific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst* 97:1124-32.

Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nature Medicine* 2011; 17: 297-303. doi: 10.1038/nm.2323.

Chung DC. 2000. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 119:854.

Compton C, Hawk ET, Grochow L, Lee F, Ritter M, Niederhuber JE. 2008. Colon cancer. In: Abeloff MD, Armitage J, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna GW, eds. *Abeloff's clinical oncology*. Philadelphia: Churchill Livingstone 1477-534.

Cordon-Cardo C, Prives C. 1999. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J. Exp Med* 190:1367–70.

Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13:1382–97.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-45.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10158-63.

Debinski HS, Love S, Spigelman AD, Phillips RK. 1996. Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 110:1028.

Debinski HS, Spigelman AD, Hatfield A, et al. 1995. Upper intestinal surveillance in familial adenomatous polyposis. *Eur J Cancer* 31A:1149.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. 2008. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:5705-12.

Dionigi G, Bianchi V, Villa F, Rovera F, Boni L, Annoni M et al. 2007. Differences between familial and sporadic forms of colorectal cancer with DNA microsatellite instability. *Surgical Oncology* 16: 537-42.

Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol* 10:262–7.

Entius MM, Keller JJ, Westerman AM, et al. 2001. Molecular genetic alterations in hamartomatous polyps and carcinomas of patients with Peutz-Jeghers syndrome. *J Clin Pathol* 54:126.

Entius MM, Westerman AM, van Velthuisen ML, et al. 1999. Molecular and phenotypic markers of hamartomatous polyposis syndromes in the gastrointestinal tract. *Hepatogastroenterology* 46:661.

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, et al. 1996. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF β -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86:543-52.

Esplin ED, Snyder MP. *World J Clin Oncol.* 2014 10; 5(5): 1036-47. Doi: 10.5306/wjco.v5.i5.1036

Evan G. 1998. A Matter of Life and Cell Death. *Science* 281:1317-22.

Fearon ER, Bommer GT. 2008. Molecular biology of colorectal cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *De-Vita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1218-31.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49.

Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759.

Fedi P, Tronick SR, and Aaronson SA. 1997. Growth factors. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, E. Frei DW. *Cancer Medicine*. Kufe, Weichselbaum RR (eds). Baltimore MD: Williams and Wilkins 41–64.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75:1027-38. [Erratum, *Cell* 1994;77:167.]

Fletcher JA, Pinkus JL, Lage JM, et al. 1992. Clonal 6p21 rearrangement is restricted to the mesenchymal component of an endometrial polyp. *Genes Chromosomes Cancer* 5:260.

Foley TR, McGarrity TJ, Abt AB. 1988. Peutz-Jeghers syndrome: a clinicopathologic survey of the "Harrisburg family" with a 49-year follow-up. *Gastroenterology* 95:1535.

Frayling IM, Beck NE, Ilyas M, et al. 1998. The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10722.

Giancotti FG, and Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028–1032.

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. 2000. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119:1447.

Goel A, Arnold CN, Boland CR. 2001. Multistep progression of colorectal cancer in the setting of microsatellite instability: new details and novel insights. *Gastroenterology* 121:1497.

Goss KH, Groden J. 2000. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18:1967-79.

Grady WM, Markowitz S. 2002. Colorectal cancer: genetic alterations. In: Kelsen D, Daly J, Kern S, Levin B, Tepper J, eds. *Gastrointestinal oncology: principles and practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 685-702.

Grady WM, Markowitz SD. 2008. TGF- β signaling pathway and tumor suppression. In: Derynck R, Miyazano K, eds. *The TGF- β family*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 889-938.

Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. 1999. Mutational inactivation of transforming growth factor β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 59:320-4.

Green SE, Bradburn DM, Varma JS, Burn J. 1998. Hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 13:3.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. 1991. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66:589.

Grotsky HW, Rickert RR, Smith WD, Newsome JF. 1982. Familial juvenile polyposis coli: a clinical and pathologic study of a large kindred. *Gastroenterology* 82:494.

Gruber SB, Entius MM, Petersen GM, et al. 1998. Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer Res* 58:5267.

Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. 1999. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 116:1063.

Gurbuz AK, Giardiello FM, Petersen GM, et al. 1994. Desmoid tumours in familial adenomatous polyposis. *Gut* 35:377.

Guttmacher AE, Collins FS, Carmona RH. Family History-More Important Than Ever. *N Engl J Med*. 2016; 351: 2333-6. www.nejm.org
doi:10.1056/NEJMs042979

Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen, Lbrooks RMW, and Weinberg RA. 1999. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 440: 464–468.

Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. 1995. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332:839.

Hamosh A, McInnes RR, Nussbaum RL, Willard HF, Lisi EC, Sobreira N. Lynch syndrome (DNA Mismatch Repair Gene Mutation, MM 120435. *Clinical Case Studies Illustrating Genetic principles*. In: *Genetics in Medicine*. 8th Eds. Thomson

& Thomson. Elsevier 2016; 145-6. www.unife.it › materiale-didattico › t-t_cases_copy www.elsevier.com › books › nussbaum

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. 2005. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 352:1851-60.

Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353–64.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The Hallmark of Cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hatta M, Surachmanto EE, Islam AA, Wahid S. Expression of mRNA IL-17F and sIL-17F in atopic asthma patients. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):202. Published 2017 Jun 12. doi:10.1186/s13104-017-2517-93.

He YQ, Sheng JQ, Ling XL et al. 2012. Estradiol regulates miR-135b and MMR expressions via estrogen receptor- β in colorectal cells. *Experimental and Molecular Medicine* 44 (12): 723 – 32.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. 1998. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391:184.

Hemminki K, Mutanen P. 2001. Genetic epidemiology of multistage carcinogenesis. *Mutat Res* 473:11-21.

Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6870-5.

Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6870.

Houlston R, Bevan S, Williams A, et al. 1998. Mutations in DPC4 (SMAD4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases. *HumMol Genet* 7:1907.

Houlston R, Crabtree M, Phillips R, Tomlinson I. 2001. Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut* 48:1

Houlston RS, Webb E, Broderick P, et al. 2008. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet* 40:1426-35.

Huang SC, Chen CR, Lavine JE, et al. 2000. Genetic heterogeneity in familial juvenile polyposis. *Cancer Res* 60:6882.

Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. 1999. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190:1375-82.

Hundt S, Haug U, Brenner H. 2009. Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Ann Intern Med* 150:162-9.

Hunter T. 1997. Oncoprotein networks. *Cell* 88:333-46.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335-42.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. 2004. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average risk population. *N Engl J Med* 351:2704-14.

Ionov Y, Peinado M, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-61.

Issa JP. 2004. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:988-93.

Itzkowitz S, Brand R, Jandorf L, et al. 2008. A simplified, noninvasive stool DNA test for colorectal cancer detection. *Am J Gastroenterol* 103:2862-70.

Itzkowitz SH, Jandorf L, Brand R, et al. 2007. Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:111-7.

Jacoby RF, Schlack S, Cole CE, et al. 1997. A juvenile polyposis tumor suppressor locus at 10q22 is deleted from nonepithelial cells in the lamina propria. *Gastroenterology* 112:1398.

Jacoby RF, Schlack S, Sekhon G, Laxova R. 1997. Del(10) (q22.3q24.1) associated with juvenile polyposis. *Am J Med Genet* 70:361.

Jang YS, Steinhagen RM, Heimann TM. 1997. Colorectal cancer in familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 40:312.

Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. 2000. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 118:829-34.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2044-2058. Doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054.

Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, et al. 1994. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 14:1631.

Jass JR, Stewart SM. 1992. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 33:783.

Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. 2002. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *European Journal of Cancer* 39: 858-66.

Jass JR. 2000. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 910:62.

Jass JR. 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50:113-30.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. 2008. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 58:71-96.

Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, et al. 1994. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 54:5523.

Jenne DE, Reimann H, Nezu J, et al. 1998. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 18:38.

Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, et al. 2008. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 68: 1953-61.

Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analysis of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes control*. NIH-PA Author Manuscript 2013; 24(6):1207-1222. Doi:10.1007/s10552-013-0201.5.

Johnson JP. 1991. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 10:11-22.

Jones IT, Jagelman DG, Fazio VW, et al. 1986. Desmoid tumors in familial polyposis coli. *Ann Surg* 204:94.

Jones S, Chen WD, Parmigiani G, et al. 2008. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4283-8.

Jones S, Emmerson P, Maynard J, et al. 2002. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations. *Hum Mol Genet* 11:2961-7.

Kamory E, Olasz J, Czuka O. 2008. Somatic APC Inactivation Mechanisms in Sporadic Colorectal Cancer Cases in Hungary. *Pathol.Oncol.Res* 14:51-6.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57:808-11.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359:1757-65.

Kastrinos F, Syngal S. 2007. Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations. *Semin Oncol* 34:418-24.

Kiel KD, Suit HD. 1984. Radiation therapy in the treatment of aggressive fibromatoses (desmoid tumors). *Cancer* 54:2051

Kilpivaara O, Aaltonen LA. Diagnostic Cancer Genome Sequencing and the Contribution of Germline Variants. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1559-62. doi: 10.1126/science.1233899.

Kim ER, Kim YH. Clinical Application of Genetics in Management of Colorectal Cancer. *Intestinal research* 2014;12(3): 184-193. Doi: <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.3.184>.)

Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, et al. 2007. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 25:767-72.

Kim IJ, Ku JL, Yoon KA, et al. 2000. Germline mutations of the dpc4 gene in Korean juvenile polyposis patients. *Int J Cancer* 86:529.

Kinzbrunner B, Ritter S, Domingo J, Rosenthal CJ. 1983. Remission of rapidly growing desmoid tumors after tamoxifen therapy. *Cancer* 52:2201.

Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:661.

Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science* 280:1036.

Kinzler KW, Vogelstein B. 2002. Colorectal tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, eds. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill 583-612.

Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159–170.

Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science* 280: 1036-7.

Klein WA, Miller HH, Anderson M, DeCosse JJ. 1987. The use of indomethacin, sulindac, and tamoxifen for the treatment of desmoid tumors associated with familial polyposis. *Cancer* 60:2863.

Knudson Jr AG. 1977. Genetics and etiology of human cancer. *Adv Hum Genet* 8:1.

Ko LJ, Prives C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054.

Kolodner R. 1996. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 10:1433.

Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al. 1999. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59:5068-74.

Kondo Y, Issa JP. 2004. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23:29-9.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275:1784-7.

Kresno SB. 2011. Makna Tes Genetik dalam Upaya Mencegah Kanker. Dalam: Kresna SB. *Ilmu Dasar Onkologi*. Badan Penerbit FKUI 2ed 375-98. A Yu H, Li H, Cui Y et al. The mRNA level of MLH1 in peripheral blood is biomarker for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer.

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, et al. 1997. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 17:79.

Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, et al. 1999. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's "two-hit" hypothesis. *Nat Med* 5:1071.

Lanari A. 1983. Effect of progesterone on desmoid tumors (aggressive fibromatosis). *N Engl J Med* 309:1523.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75:1215-25.

Leary RJ, Lin JC, Cummins J, et al. 2008. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16224-9.

Leppert M, Burt R, Hughes JP, et al. 1990. Genetic analysis of an inherited predisposition to colon cancer in a family with a variable number of adenomatous polyps. *N Engl J Med* 322:904.

LeSher AR, Castronuovo Jr JJ, Filippone Jr AL. 1989. Hepatoblastoma in a patient with familial polyposis coli. *Surgery* 105:668.

Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. 2008. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 58: 130-60.

Levy DB, Smith KJ, Beazer-Barclay Y, et al. 1994. Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res* 54:5953.

Li M, Chen WD, Papadopoulos N, et al. 2009. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 27:858-63.

Li M, Wang IX, Li Y, Bruzel A, Richards AL, Toung JM, , Cheung VG. Widespread RNA and DNA Sequence Differences in the Human Transcriptome. *Science* 2011; 333: 53-8. . doi: 10.1126/science.1207018

Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. 1997. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16:64-7.

Libutti SK, Saltz LB, Tepper JE. 2008. Colon cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles and practice of oncology*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1232-84.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343: 78-85.

Lievre A, Bachet JB, Boige V, et al. 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26:374-9.

Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. 2005. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 293:1979-85.

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. 1996. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2:169.

Liu Q, Tan YQ. Advances in Identification of Susceptibility Gene Defects of Hereditary Colorectal Cancer. *J Cancer* 2019; 10(3):643-653. Doi;10.7150/jca.28542)

Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. 1993. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53:5849.

Lukashev ME, Werb Z. 1998. ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 8; 437–441.

Luongo C, Moser AR, Gledhill S, Dove WF. 1994. Loss of *Apc* in intestinal adenomas from Min mice. *Cancer Res* 54:5947.

Lynch HT, Fitzgibbons Jr R, Chong S, et al. 1994. Use of doxorubicin and dacarbazine for the management of unresectable intra-abdominal desmoid tumors in Gardner's syndrome. *Dis Colon Rectum* 37:260.

Lynch HT, Kaul K. 2000. Microsatellite instability, clinical implications, and new methodologies. *J Natl Cancer Inst* 92:511.

Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. 2008. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7:27-39.

Lynch HT, Lynch JF. 1994. 25 years of HNPCC. *Anticancer Res* 14:1617.

Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al. 1966. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 117:206.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J, et al. 1995. Update on the differential diagnosis, surveillance and management of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31A:1039.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. 1997. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 93:84.

Lynch HT, Smyrk TC, Lanspa SJ, et al. 1993. Upper gastrointestinal manifestations in families with hereditary flat adenoma syndrome. *Cancer* 71:2709.

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. 1993. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104:1535.

Lynch HT, Watson P, Krieglner M, et al. 1988. Differential diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome I and Lynch syndrome II). *Dis Colon Rectum* 31:372.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-8. [Erratum, 1993;259:878.]

Mark P. de Caestecker, Piek E, Roberts AB. 2000. Role of Transforming Growth Factor- β Signaling in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 92 (17): 1388-1402.

Markie D, Huson S, Maher E, et al. 1996. A pericentric inversion of chromosome six in a patient with Peutz-Jeghers' syndrome and the use of FISH to localise the breakpoints on a genetic map. *Hum Genet* 98:125.

Markowitz S, Wang J, Meyeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan R, Zborowska E, Kinzler K, Vogelstein B. 1995. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer-cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336-8.

Markowitz SD, Bertagnolli MM. 2009. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 361:2449-60

Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK. 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1:233-6.

Markowitz SD. 2007. Aspirin and colon cancer— targeting prevention? *N Engl J Med* 356:2195-8.

Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, et al. 1997. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 16:333-4.

Mecklin JP, Sipponen P, Jarvinen HJ. 1986. Histopathology of colorectal carcinomas and adenomas in cancer family syndrome. *Dis Colon Rectum* 29:849.

Medema RH, and Bos JL. 1993. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit. Rev. Oncog* 4:615-661.

Meyerhardt JA, Mayer RJ. 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352:476-87.

Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, et al. 1994. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 54:3011.

Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. 1997. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 17:271-2.

Miyaki M, Lijima T, Kimura J, et al. 1999. Frequent mutation of β -catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patient with HNPCC. *Cancer Research* 59: 4506-9.

Miyaki M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, et al. 1995. Familial polyposis: recent advances. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:1.

Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, et al. 2001. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 121:1300.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. 1992. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1:229.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-90.

Munden PM, Sobol WM, Weingeist TA. 1991. Ocular findings in Turcot's syndrome (gliomapolypsis). *Ophthalmology* 98:111.

Myung SJ, Rerko RM, Yan M, et al. 2006. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12098-102.

Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, et al. 1992. Correlation between the location of germline mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 52:4055.

Nakata H, Wang SL, Chung DC, et al. 1998. Oncogenic ras induces gastrin gene expression in colon cancer. *Gastroenterology* 115:1144.

Naylor EW, Lebenthal E. 1980. Gardner's syndrome: recent developments in research and management. *Dig Dis Sci* 25:945.

Neklason DW, Kerber RA, Nilson DB, et al. 2008. Common familial colorectal cancer linked to chromosome 7q31: a genomewide analysis. *Cancer Res* 68:8993-7.

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253:665.

Nosho K, Irahara N, Shima K, et al. 2008. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population based sample. *PLoS One* 3(11):e3698.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard H, Hamosh A. Cancer Genetics and Genomic. In: *Genetics in Medicine*. 8theds. Thomson & Thomson eBook. Philadelphia/Elsevier 2016: 309-32. ISBN 978-1-4377-0696-3 www.academia.edu

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard H, Hamosh A. Patterns of Single-Gene Inheritance. In: *Genetics in Medicine*. 8theds. Thomson & Thomson eBook. Philadelphia/Elsevier 2016: 107-32. ISBN 978-1-4377-0696-3 www.academia.edu

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard H, Hamosh A. Risk Assessment and Genetic Counseling. In: *Genetics in Medicine*. 8theds. Thomson & Thomson eBook. Philadelphia/Elsevier 2016: 333-48. ISBN 978-1-4377-0696-3 www.academia.edu

NW FACULTY. Developmental BioEngineering (DBE). RESEARCH. PCR PRIMER INFORMATION. <https://www.utwente.nl/en/tnw/dbe/research/pcp-primers/> (2019)

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106-10.

O'Brien MJ. 2007. Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterol Clin North Am* 36:947-68.

Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. 2009. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 58:90-6.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, and Cunha GR. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 59:5002–11.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al. 1994. Mutations of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263: 1625-9.

Papaemmanuil E, Carvajal-Carmona L, Sellick GS, et al. 2008. Deciphering the genetics of hereditary non-syndromic colorectal cancer. *Eur J Hum Genet* 16:1477-86.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807-12.

Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, et al. 2005. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 436:792.

Parsons R, Myeroff LL, Liu B, et al. 1995. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 55:5548-50.

Petersen GM, Slack J, Nakamura Y. 1991. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* 100:1658.

Plail RO, Bussey HJ, Glazer G, Thomson JP. 1987. Adenomatous polyposis: an association with carcinoma of the thyroid. *Br J Surg* 74:377.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359:235.

Prives C. 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95:5.

Pronk GJ, Bos JL. 1994. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Biochim Biophys Acta* 1198:131.

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934.

Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, et al. 2004. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 428:77-81.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. 2003. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracilbased adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247-57.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445:111-5.

Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, et al. 1996. MAD-related genes in the human. *Nat Genet* 13:347-9.

Robbin DH, Itzkowitz SH. 2002. The molecular and genetic basis of colon cancer. *Med Clin N Am* 86:1467-95.

Robson ME, Storm CD, Weitzel J, Wollins DS, Offit K. 2010. Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. American Society of Clinical Oncology Policy Statement. *J Clin Oncol* 28: 5.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. 1997. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89:1758.

Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulos A. 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hot spot" and interdependence of the "two hits". *PNAS* 97 : 3352-7.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, et al. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262:1731.

Sachatello CR, Pickren JW, Grace Jr JT. 1970. Generalized juvenile gastrointestinal polyposis: a hereditary syndrome. *Gastroenterology* 58:699.

Salovaara R, Loukola A, Kristo P, et al. 2000. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:2193.

Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. 2004. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22:1201-8.

Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, et al. 2001. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 121:830.

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, et al. 2001. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:917-23.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304:554.

Sandler RS, Halabi S, Baron JA, et al. 2003. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 348:883-90. [Erratum, *N Engl J Med* 2003; 348:1939.]

Schutte M, Hruban R, Hedrick L, Cho K, Nadasdy G, Weinstein C, Bova G, Isaacs W, Cairns P, Nawroz H. 1996. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 56:2527-30.

Shen L, Toyota M, Kondo Y, et al. 2007. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18654-9.

Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, et al. 1994. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 6:273.

Shibata D, Reale MA, Lavin P, et al. 1996. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 335:1727.

Shih IM, Yu J, He TC, et al. 2000. The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer Res* 60:1671.

Shitoh K, Konishi F, Miyaki M, et al. 2000. Pathogenesis of non-familial colorectal carcinoma with high microsatellite instability. *J Clin Pathol* 53: 841-5.

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al.: Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67(3): 177-193, 2017. (PUBMED Abstract <https://doi.org/10.3322/caac.21395>).

Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. 2009. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:1308-24.

Sirait RH, Hatta M, Ramli M, Islam AA, Arief SK. Systemic lidocaine inhibits high mobility group box 1 messenger ribonucleic acid expression and protein in BALB/c mice after closed fracture musculoskeletal injury. *Saudi J Anaesth.* 2018;12:395-8. DOI: 10.4103/sja.SJA_685_17

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268-74.

Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, et al. 1993. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2846.

Soussi T, editor. 2002. Institut Curie. Available at: <http://p53.curie.fr>. Accessed October.

Spirio L, Olschwang S, Groden J, et al. 1993. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75:951.

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS, et al. 2000. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342:1946-52.

Stevenson JK, Reid BJ. 1986. Unfamiliar aspects of familial polyposis coli. *Am J Surg* 152:81.

Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early onset colorectal cancer; A sporadic or inherited disease(?). *World J Gastroenterol.* 2014;20(35):12420-30. Doi 10.3748/wjg.v20.i35.12420

Su LK, Johnson KA, Smith KJ, et al. 1993. Association between wild type and mutant APC gene products. *Cancer Res* 53:2728.

Sudoyo AW. 2005. Kanker Kolorektal Usia Muda etnik Jawa, Sunda, Makasar, dan Minang di Indonesia. *Kajian Klinikopatologi dan Imunohistokimia Instabilitas Mikrosatelit. Disertasi Program Doktor Ilmu Kedokteran FKUI. Jakarta* 118.

Tambaip T, Karo BR, Hatta M, Dwiyanti R, Natzir R, Massi MN, Islam AA, Djawad K, Immunomodulatory effect of orally red fruit (*Pandanus conoideus*) extract on the expression of CC chemokine receptor 5 mRNA in HIV patients with antiretroviral therapy. 2018. *Res. J. Immunol.*, 11: 15-21. DOI: 10.3923/rji.2018.15.21.

Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, et al. 2008. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet* 40:631-7.

Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, et al. 1996. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 13: 343-6.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816-9.

Tie-Jun Liang TJ, Wang HX, Zheng YY, Cao YQ, Wu X et al. APC hypermethylation for early diagnosis of colorectal cancer: a meta-analysis and literature review. *Oncotarget* 2017; 8 :46468-79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17576>

Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. 2007. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 39:984-8.

Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. 2008. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet* 40:623-30.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J, Baylin SB, Issa JP. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8681-6.

Traboulsi EI, Krush AJ, Gardner EJ, et al. 1987. Prevalence and importance of pigmented ocular fundus lesions in Gardner's syndrome. *N Engl J Med* 316:661.

Tsukada K, Church JM, Jagelman DG, et al. 1991. Systemic cytotoxic chemotherapy and radiation therapy for desmoid in familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 34:1090.

Turnpenny PD, Ellard S. Patterns of Inheritance. In: Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics 15thEds.* Elsevier 2017: 66-82 www.elsevier.com › turnpenny › 978-0-7020-6685-6

Turnpenny PD, Ellard S. Risk Calculation. . In: Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics 15thEds.* Elsevier 2017: 94-101 www.elsevier.com › turnpenny › 978-0-7020-6685-6

Turnpenny PD, Ellard S. The Cellular and Molecular Basis of Inheritance. In: Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics 15thEds.* Elsevier 2017: 9-23. ISBN: 978-0-7020-6685-6 www.elsevier.com

Turnpenny PD, Ellard S. The Genetics of Cancer and Cancer Genetics. In: Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics 15thEds.* Elsevier 2017: 177-99 www.elsevier.com › turnpenny › 978-0-7020-6685-6

Utsunomiya J, Nakamura T. 1975. The occult osteomatous changes in the mandible in patients with familial polyposis coli. *Br J Surg* 62:45.

Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. 2007. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25: 1658-64.

Van de Water NS, Jeevaratnam P, Browett PJ, et al. 1994. Direct mutational analysis in a family with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Aust N Z J Med* 24:682.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34:424.

Vasen HF, Sanders EA, Taal BG, et al. 1996. The risk of brain tumours in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Int J Cancer* 65:422.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116:1453.

Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. 1996. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 110:1020.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7:979-87.

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, et al. 1998. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8698-702.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-59. doi: 10.1126/science.1235122

Wallis YL, Macdonald F, Hulten M, et al. 1994. Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 94:543.

Walsh N, Qizilbash A, Banerjee R, Waugh GA. 1987. Biliary neoplasia in Gardner's syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 111:76.

Warthin AS. 1925. The further study of a cancer family. *J Cancer Res* 9:279.

Watanabe A, Nagashima H, Motoi M, Ogawa K. 1979. Familial juvenile polyposis of the stomach. *Gastroenterology* 77:148.

Watanabe T, Wu T-T, Catalano PJ, et al. 2001. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344:1196-206.

Watson P, Lynch HT. 1993. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 71:677.

Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. 1994. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med* 96:516.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38:787-93.

Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, et al. 2002. An insight into the genetic pathway of adenocarcinoma of the small intestine. *Gut* 50:218.

Wiesner GL, Daley D, Lewis S, et al. 2003. A subset of familial colorectal neoplasia kindreds linked to chromosome 9q22.2-31.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12961-5.

Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, et al. 1999. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 23:142.

Wong R, Cunningham D. 2008. Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies. *J Clin Oncol* 26:5668-70. [Erratum, *J Clin Oncol* 2009;27:3070.]

Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108-13.

Wu TT, Rezai B, Rashid A, et al. 1999. Genetic alterations and epithelial dysplasia in juvenile polyposis syndrome and sporadic juvenile polyps.

Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, et al. 1999. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet* 65:1291.

Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, et al. 2001. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 29:137.

Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J, et al. 1997. MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes Cancer* 18:269.

Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Nosho K, Suzuki H, Shinomura Y. 2012. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 14 (22): 2745-55.

Yan M, Rerko RM, Platzer P, et al. 2004. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF- β -induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17468-73.

Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Brainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorder. *N Engl J Med*. 2013 Oct 17;369(16):1502-11. doi: 10.1056/NEJMoa1306555. Epub 2013 Oct 2

Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, et al. 2001. Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res* 61:2676.

Yin Y, Shen WH. 2008. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* 27: 5443-53.

Yu H, Li H, Cui Y et al. 2016. The mRNA level of MLH1 in peripheral blood is biomaker for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 6(5): 1135 – 40.

Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, et al. 2007. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 39:989-94.

Zhiheng Zhou, Haibai Liu, Caixia Wang, Qian Lu, Qin Hai Huang, Chanjiao Zheng, Yixiong Lei. referensi Long non-coding RNAs as novel expression signatures modulate DNA damage and repair in cadmium toxicology. *Sci Rep.* 2015; 5: 15293. Published online 2015 Oct 16. doi: 10.1038/srep15293. PMCID: PMC460788.

Zou H, Harrington JJ, Shire AM, et al. 2007. Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2686-96.