

TESIS
HUBUNGAN EKSPRESI MLH1
DENGAN ASPEK KLINIKOPATOLOGIS PADA KANKER KOLOREKTAL
DI RUMAH SAKIT WAHIDIN SUDIROUSODO, MAKASSAR
ASSOCIATION OF MLH1 EXPRESSION WITH CLINICOPATHOLOGICAL
ASPECTS IN COLORECTAL CANCER PATIENTS AT DR WAHIDIN
SUDIROHUSODO HOSPITAL, MAKASSAR INDONESIA



Oleh :

dr. Zesmarhchis

C045192011

PROGRAM STUDI ILMU BEDAH
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
DEPARTEMEN ILMU BEDAHFAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR
2024

TESIS
HUBUNGAN EKSPRESI MLH1
DENGAN ASPEK KLINIKOPATOLOGIS PADA KANKER KOLOREKTAL
DI RUMAH SAKIT WAHIDIN SUDIROHUSODO, MAKASSAR
ASSOCIATION OF MLH1 EXPRESSION WITH CLINICOPATHOLOGICAL
ASPECTS IN COLORECTAL CANCER PATIENTS AT DR WAHIDIN
SUDIROHUSODO HOSPITAL, MAKASSAR INDONESIA



Oleh :

dr. Zesmarhchis

C045192011

PROGRAM STUDI ILMU BEDAH
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
DEPARTEMEN ILMU BEDAHFAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR
2024

**`HUBUNGAN EKSPRESI MLH1
DENGAN ASPEK KLINIKOPATOLOGIS PADA KANKER KOLOREKTAL
DI RUMAH SAKIT WAHIDIN SUDIROHUSODO, MAKASSAR**

TESIS

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis-1 (Sp-1)

Program Studi

Ilmu Bedah

Disusun dan diajukan oleh :

dr. Zesmarhchis

C045192011

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (SP-1)
PROGRAM STUDI ILMU BEDAH FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**HUBUNGAN EKSPRESI MLH1 DENGAN ASPEK KLINIKOPATOLOGIS
PADA KANKER KOLOREKTAL DI RUMAH SAKIT WAHIDIN
SUDIROHUSODO, MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh :

ZESMARHCHIS

Nomor Pokok : C045192011

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang
dibentuk dalam rangka penyelesaian Studi
Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu Bedah
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 09 Mei 2024

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui :

Pembimbing Utama

dr. M. Ihwan Kusuma, Sp.B, Subs.BD(K)

NIP. 19751017 2020015 001

Ketua Program Studi

Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Sachraswaty R. Laiding, Sp.B Sp.BP-RE (K)
NIP. 19760112 200604 2 001

Prof. Dr. Dr. Haerani Rasvid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK
NIP. 19680530 199603 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : ZESMARHCHIS

NIM : C045192011

JUDUL :

HUBUNGAN EKSPRESI MLH1 DENGAN ASPEK KLINIKOPATOLOGIS PADA KANKER KOLOREKTAL DI RUMAH SAKIT WAHIDIN SUDIROHUSODO, MAKASSAR

Dengan ini menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya ilmiah yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa makalah ini adalah hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut .

Makassar, 23 November 2024



Zesmarhchis
C045201001

KATA PENGANTAR

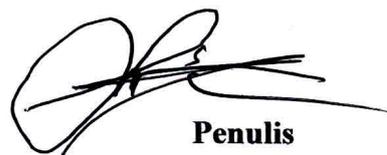
Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua. Shalawat beserta salam semoga tercurah kepada Rasulullah SAW beserta keluarganya.

Hasil penelitian ini diajukan sebagai bagian dari tugas akhir dalam rangka menyelesaikan studi di Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Dalam penyelesaian hasil penelitian ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih setulusnya kepada semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya hasil penelitian penelitian ini.

Dalam penyusunan hasil penelitian ini, penulis menyadari sepenuhnya bahwa proposal ini masih jauh dari kesempurnaan karena pengalaman dan pengetahuan penulis yang terbatas. Oleh karena itu, kritik dan saran dari semua pihak sangat kami harapkan demi terciptanya hasil penelitian yang lebih baik lagi untuk masa mendatang.

Makassar, 27 April 2024



Penulis

**HUBUNGAN EKSPRESI MLH1
DENGAN ASPEK KLINIKOPATOLOGIS PADA KANKER KOLOREKTAL
DI RUMAH SAKIT WAHIDIN SUDIROHUSODO, MAKASSAR**

Running title: MLH1 Expression and CRC Clinicopathology

ABSTRAK

Pendahuluan: Kanker kolorektal (CRC) merupakan masalah kesehatan yang signifikan, menempati urutan keempat di antara penyakit ganas. Faktor yang berkontribusi terhadap CRC meliputi diet, gaya hidup, dan mutasi genetik. Mutasi pada gen seperti MLH1, yang terlibat dalam perbaikan DNA, dapat meningkatkan risiko kanker, terutama pada sindrom Lynch. Memahami ekspresi MLH1 pada pasien CRC sangat penting untuk perawatan yang disesuaikan dan hasil yang lebih baik. Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki hubungan antara ekspresi MLH1 dengan aspek klinikopatologi pada pasien kanker kolorektal di Rumah Sakit Umum Wahidin Sudirohusodo.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian cross sectional dengan mengevaluasi ekspresi MLH1 dalam 45 sampel jaringan dari pasien kanker kolorektal menggunakan metode imunohistokimia. Data tentang usia, jenis kelamin, golongan darah, stadium, lokasi kanker kolorektal, gradasi, dan subjek studi dikumpulkan dari riwayat medis.

Hasil: Sebagian besar pasien berusia lebih dari 65 tahun (31,1%), perempuan (53,3%), dan stadium III (40,0%). Ekspresi protein MLH1 positif pada 91,1% kasus.

Tidak ada hubungan signifikan antara ekspresi MLH1 dengan jenis kelamin, kelompok usia, atau golongan darah. Lokasi tumor menunjukkan hubungan signifikan, lebih banyak kasus positif ditemukan di kolon kiri dan rektum. Ada hubungan signifikan antara gradasi histopatologis dan ekspresi MLH1.

Kesimpulan: Penelitian ini menemukan prevalensi CRC yang lebih tinggi pada wanita, bertentangan dengan beberapa temuan sebelumnya yang menunjukkan jenis kelamin pria sebagai faktor risiko. Tidak ditemukan hubungan signifikan antara ekspresi MLH1 dan jenis kelamin, usia, stadium kanker, atau golongan darah, meskipun lokasi tumor dan grade histopatologi berhubungan secara signifikan dengan ekspresi MLH1, dengan kasus ekspresi negatif terutama pada tumor kolon kanan.

Keywords: *colorectal cancer, MLH1, clinicopathology*

**Association of MLH1 Expression with Clinicopathological
Aspects In Colorectal Cancer patients at Dr Wahidin
Sudirohusodo Hospital, Makassar Indonesia: A cross-sectional
study**

Running title: MLH1 Expression and CRC Clinicopathology

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) ranks fourth among malignant diseases, with factors such as diet, lifestyle, and genetic mutations contributing to its development. Mutations in DNA repair genes like MLH1 can increase cancer risk. Understanding MLH1 expression in CRC is essential for tailored treatments. This study investigates the relationship between MLH1 expression and CRC at Wahidin Sudirohusodo General Hospital.

Methods: This observational analytical study with cross sectional study evaluated MLH1 expression in 45 tissue samples from CRC patients using immunohistochemistry method. Data on age, gender, blood type, stage, CRC location, grading, and study subjects were collected from medical resumes.

Results: Most patients were over 65 years old (31.1%), female (53.3%), and at stage III (40.0%). MLH1 protein expression was positive in 91.1% of cases. No significant association was found between sex, age group, or blood type and MLH1 expression. However, tumor location was significantly associated with MLH1, with more positive cases in the left colon and rectum. A significant relationship was also found between histopathological grading and MLH1 expression.

Conclusion: This study found a higher CRC prevalence in women, contrary to some previous findings suggesting male sex as a risk factor. No significant associations were found between MLH1 expression and sex, age group, cancer stage, or blood type, although tumor location and histopathological grading significantly correlated with MLH1 expression, with negative expression cases predominantly in right colon tumors.

Keywords: *colorectal cancer, MLH1, clinicopathology*

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
BAB I.	1
PENDAHULUAN	1
1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	4
1.3.Tujuan Penelitian	4
1.4.Manfaat Penelitian	4
BAB II. ...	6
TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kanker Kolorektal	6
2.1.1 Epidemiologi Kanker Kolorektal	6
2.1.2 Faktor Risiko	7
2.2 Karsinogenesis Kanker Kolorektal	13
2.2.1 Tahap Inisiasi	15
2.2.2 Tahap Progresi	16
2.3 Dasar Molekuler Kanker Kolorektal	17
2.4 Jalur Molekuler Kanker Kolorektal	18
2.4.1 Jalur Ketidakstabilan Kromosom (CIN)	19
2.4.2 Jalur Ketidakstabilan <i>Mismatch Repair</i> (MSI)	20
2.4.3 Jalur Fenotipe Metilator Pulau CpG (CIMP)	22
2.5 Mismatch Repair (MMR)	24

2.6 Implikasi Klinis Pemahaman Jalur Molekuler Kanker Kolorektal	28
2.7 Pemeriksaan MSI dan MMR.....	30
2.7.1 Pemeriksaan MSI.....	32
2.7.2 Pemeriksaan MMR.....	34
2.8 Immunohistochemistry (IHC)	36
2.9 Pemeriksaan Indirek MSI Melalui Imunohistokimia MMR	37
2.10 MutL Homolog 1 (MLH1).....	38
2.11 Peran MLH1 Pada Kanker Kolorektal	39
BAB III.	43
KERANGKA KONSEP	43
3.1 Kerangka Teoritis.....	43
3.2 Kerangka Konsep	45
3.3 Hipotesis Penelitian.....	45
BAB IV.	46
METODE PENELITIAN	46
4.1 Jenis Dan Desain Penelitian	46
4.2 Rancangan Penelitian	46
4.3 Lokasi Penelitian	47
4.4 Waktu Penelitian	47
4.5 Penentuan Sumber Data	47
4.5.1 Populasi	47
4.5.2 Sampel Penelitian Dan Cara Pengambilan.....	47
4.5.3 Jumlah Sampel	48
4.5.4 Teknik Pengambilan Sampel	48
4.6 Variabel Penelitian	49
4.6.1 Variabel Bebas	49
4.6.2 Variabel Tergantung.....	49
4.6.3 Variabel Penyerta	49
4.6.4 Definisi Operasional Variabel.....	49
4.7 Alur Penelitian	52
4.8 Prosedur Penelitian	53

4.8.1	Persiapan Sampel	54
4.8.2	Prosedur Ekstraksi DNA	54
4.8.3	Prosedur Pemeriksaan Imunohistokimia MMR.....	54
4.9	Analisis Data	55
4.9.1	Analisis Univariat	55
4.9.2	Analisis Bivariat.....	55
BAB IV.	56
HASIL PENELITIAN	56
4.1	Karakteristik Sampel.....	56
4.1.1	Hubungan Karakteristik dengan Ekspresi MLH1	58
4.1.2	Hubungan Usia dengan Ekspresi MLH1	58
4.1.3	Hubungan Golongan Darah A,B,AB dengan MLH1	60
4.1.4	Hubungan Lokasi Tumor dengan Ekspresi MLH1	61
4.1.5	Hubungan Stadium Kanker Kolorektal dengan MLH1	61
4.1.6	Hubungan Grading Histopatologi Kanker Kolorektal MLH1	62
BAB V.	64
PEMBAHASAN	64
BAB VI.	70
PENUTUP	70
6.1	Kesimpulan Penelitian	70
6.2	Saran Peneliti	70
DAFTAR PUSTAKA	71

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Tahap Karsinogenesis	8
Gambar 2.2 : Multifaktor Karsinogenesis Kolorektal	16
Gambar 2.3 : Jalur yang mengatur urutan Adenokarsinoma Kolorektal	33
Gambar 2.4 : Fragmen elektroforesis kapiler analisis	34
Gambar 2.5 : Algoritma untuk evaluasi sistematis pada pasien kanker kolorektal	36
Gambar 2.6 : Deteksi MSI atau defisiensi MMR dengan Imunohistokimia	40
Gambar 2.7 : Mekanisme MMR	41
Gambar 3.1 : Kerangka Teori	43
Gambar 3.2 : Kerangka Konsep Penelitian	49
Gambar 4.1 : Rancangan Penelitian Cross Sectional	43
Gambar 4.2 : Bagan Alur Penelitian	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1: Karakteristik subjek penelitian	52
Tabel 4.1.1: Hubungan Jenis Kelamin dengan Ekspresi MSH2	54
Tabel 4.1.2: Hubungan Umur dengan Ekspresi MSH2	54
Tabel 4.1.3: Hubungan Golongan Darah dengan Ekspresi MSH2	55
Tabel 4.1.4: Hubungan Lokasi Tumor dengan Ekspresi MSH2	56
Tabel 4.1.5: Hubungan Stadium Kanker dengan Ekspresi MSH2	56
Tabel 4.1.6: Hubungan <i>Grading</i> Tumor dengan Ekspresi MSH2	57

DAFTAR SINGKATAN

SEER	:	<i>Surveillance, Epidemiology, And End Results</i>
WHO	:	Organisasi Kesehatan Dunia
FIT	:	<i>Fecal Immunochemical Test</i>
ECM	:	Matriks Ekstraseluler
MMP	:	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MMP-9	:	<i>Matrix-Metalloproteinase-9</i>
HDI	:	Indeks Pembangunan Manusia
FAP	:	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
HNPCC	:	<i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>
SSE	:	Status Sosial Ekonomi
CAF	:	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
CRC	:	<i>Colorectal Cancer</i>
FOBT	:	<i>Fecal Occult Blood Testing</i>
DC	:	<i>Dendritic Cell</i>
LOH	:	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
NK	:	<i>Natural Killer</i>
TAM	:	<i>Tumour-Associated Macrophage</i>
TAN	:	<i>Tumour-Associated Neutrophil</i>
TME	:	<i>Tumor Microenvironment</i>
IEC	:	<i>Intestinal Epithelial Cells</i>
APC	:	Adenomatous Polyposis Coli
LS	:	<i>Sindrom Lynch</i>
MSI-H	:	<i>High-Level Microsatellite Instability</i>
CCS	:	<i>Colon Cancer Susceptibility</i>
CIMP	:	<i>Cpg Island Methylator Phenotype</i>
CIN	:	<i>Chromosomal Instable</i>
MSI	:	<i>Microsatellite Instable</i>

NOS	:	<i>Not Otherwise Specified</i>
SCC	:	Kanker Kolorektal Sporadis
FCC	:	Kanker Kolorektal Familial
ICC	:	Kanker Kolorektal Herediter
gFOBT	:	<i>Guaiac Fecal Occult Blood Test</i>
OC	:	Kolonoskopi Optik
FS	:	Sigmoidoskopi Fleksibel
DRE	:	<i>Digital Rectal Exam</i>
CCE	:	<i>Colon Capsule Endoscopy</i>
CTC	:	<i>Computed Tomographic Colonography</i>
DW-MRI	:	<i>Diffusion-Weighted MRI</i>
FAP1-PET	:	<i>Fibroblast Activation Protein Inhibitor–Positron Emission Tomography</i>
CEA	:	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
MRI	:	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
PET-CT	:	<i>Positron Emission Tomography-Computed Tomography</i>
MMR	:	<i>Mismatch Repair</i>
MAPK	:	<i>Mitogenic-Activated Protein Kinase</i>
PI3K	:	Phosphatidylinositol 3-Kinase
EGFR	:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
AJCC	:	<i>American Joint Committee On Cancer</i>
UICC	:	<i>International Union For Cancer Control</i>
IMRT	:	Radioterapi Modulasi Intensitas
5-FU	:	5-Fluorourasil
mCRC	:	Kanker Kolorektal Metastatik
TF	:	Faktor Transkripsi
AP-1	:	Protein Aktivator-1
NF-κB	:	<i>Nuclear Factor-Kb</i>
PEA3	:	<i>Aktivator-3 Enhancer Polyomavirus</i>

IFN γ	:	Interferon- Γ
IL-1 β	:	Interleukin 1 β
TGF- β	:	<i>Transforming Growth Factor B</i>
PDGF	:	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
bFGF	:	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
EMT	:	Transisi Epitel-Mesenkim
CAF	:	Fibroblas Terkait Kanker
DAMP	:	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
COL4 α 3	:	Rantai A3 Kolagen Tipe IV
CAC	:	Kanker Terkait Kolitis
ROC	:	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ELISA	:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Di Indonesia, KKR merupakan masalah kesehatan dengan peringkat penyakit keganasan keempat tertinggi. Insiden per 100.000 penduduk sebesar 12,4 kejadian, dan angka kematian sebesar 6,9 kejadian. Dalam lima tahun terakhir didapatkan prevalensi kejadian KKR sebesar 64.664 kasus dan pada tahun 2018, tercatat kasus baru sebesar 30.023 kasus dengan angka kematian tercatat 16.034 kasus. Berdasarkan Provinsi, Sulawesi Selatan masuk dalam 10 Provinsi dengan prevalensi kanker terbesar di Indonesia yakni sebesar 4,8 per 100.000 penduduk (Bray et al., 2018).

Terjadinya KKR mungkin tergantung pada berbagai faktor, yaitu pola makan, gaya hidup dan parameter lingkungan lainnya, termasuk mutagen lingkungan dan makanan yang ditularkan. Selain itu, faktor risiko KKR juga mencakup mikrobiota usus dan peradangan testinal kronis yang mendahului perkembangan tumor. Diperkirakan bahwa peradangan kronis, kemungkinan besar disebabkan oleh mikrobiota usus yang tidak teratur, berkontribusi pada sekitar 20% dari semua kasus KKR (Hamza., 2017).

Transformasi epitel kolon normal menjadi lesi prakanker (adenoma) dan akhirnya menjadi karsinoma yang invasif disebabkan karena akumulasi mutasi genetik baik somatik (didapat) dan/atau germline (yang diturunkan). Teori karsinogenesis kolon menampilkan evolusi mutasi klonal yang memberikan sel peluang sehingga memungkinkan untuk mengembangkan lebih banyak mutasi dan menyebabkan terjadinya proses karsinogenesis, seperti proliferasi, invasi, metastasis, dan lain-lain . Sebagian besar karsinoma kolorektal muncul secara sporadis melalui proses multi-tahap dengan adenoma sebagai tahap antara dalam perkembangan adenoma-carcinoma sequence. Gen-gen yang berperan dalam perkembangan karsinoma kolorektal meliputi Oncogen (K-ras), Tumor Suppressor gen (APC, DCC, P53) dan Mismatch repair (MMR) gen (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS2). K-ras merupakan suatu oncogen yang mengalami mutasi lebih awal dengan frekuensi

mutasi yang berbeda-beda dari 10-15 % pada adenoma kecil kurang 1cm dan 30 % pada adenoma besar lebih 1 cm, dan 65 % pada karsinoma kolorektal. (Hamza., 2017)

Selain itu, dilaporkan juga bahwa terdapat kejadian *Microsatellite instability* (MSI) atau ketidakstabilan mikrosatelit. Hal ini disebabkan oleh mutasi pada DNA gen MMR (Mismatch Repair) atau perbaikan ketidakcocokan seperti MLH1, MSH2, MSH6, dan PMS2, dan ditemukan pada 10% sampai 15% dari kanker kolorektal (KKR). Kehadiran MSI memprediksi hasil pada kanker kolorektal. Dilaporkan bahwa tingkat kelangsungan hidup pasien KKR dengan MSI hingga 15% lebih tinggi karena dibandingkan dengan pasien KKR dengan mikrosatelit stabil (MSS) tumor. Status MSI memiliki peran penting dalam keputusan pengobatan untuk KKR tahap II. Komprehensif Nasional Pedoman Jaringan Kanker (NCCN) tidak merekomendasikan kemoterapi untuk pasien ini karena prognosis yang baik dari pasien dengan MSI tinggi MSI stadium II KKR . Namun, alasannya untuk prognosis baik mereka masih belum jelas. Selain itu, MSI memiliki beberapa masalah yang membatasi penggunaannya sebagai prognostik praktis faktor di semua tahap KKR (Kang et al., 2018).

MSI jarang ditemukan pada polip, kecuali pada sindrom Lynch. Lebih-lebih lagi, individu dengan sindrom Lynch sering berkembang menjadi MSI KKR karena mutasi germline di salah satu gen MMR (MLH1, MSH2, MSH6, dan PMS2); mutasi pada MLH1 atau MSH2 yang menyebabkan peningkatan risiko (70-80%) terkena kanker, sementara mutasi pada MSH6 atau gen PMS2 memiliki risiko yang relatif lebih rendah (25-60%) dari perkembangan kanker. Sebaliknya, KKR MSI sporadis sering kali menunjukkan hilangnya aktivitas MMR karena MLH1 membungkam dengan metilasi DNA menyimpang (Maliki et al., 2020).

MLH1 (MutL Protein Homolog 1) merupakan MMR gen yang terletak pada p-arm 21.3 kromosom 3. Dan MMR DNA sangat diperlukan untuk menjaga integritas informasi genetik. Perubahan reproduktifitas mikrosatelit disebabkan oleh tergelincirnya ketidakselarasan engsel selama replikasi DNA, yang disebut juga dengan ketidakstabilan mikrosatelit. Cacat pada jalur perbaikan DNA ini

berhubungan dengan beberapa tumor manusia. Gen perbaikan ketidakcocokan mutan sering diekspresikan pada pasien dengan ketidakstabilan mikrosatelit frekuensi tinggi (MSI-H), yang berhubungan dengan penyakit genetik dominan autosomal. Gen MLH1 memberikan instruksi untuk membuat protein yang berperan penting dalam memperbaiki DNA. Protein ini membantu memperbaiki kesalahan yang terjadi ketika DNA disalin (replikasi DNA) dalam persiapan pembelahan sel. Protein MLH1 bergabung dengan protein lain yang disebut PMS2 (diproduksi dari gen PMS2), untuk membentuk kompleks dua protein yang disebut dimer. Kompleks ini mengoordinasikan aktivitas protein lain yang memperbaiki kesalahan yang terjadi selama replikasi DNA. Perbaikan dilakukan dengan menghilangkan bagian DNA yang mengandung kesalahan dan mengganti bagian tersebut dengan urutan DNA yang telah diperbaiki. Gen MLH1 adalah salah satu dari sekumpulan gen yang dikenal sebagai gen perbaikan ketidakcocokan (MMR). Sekitar 40 persen dari semua kasus sindrom Lynch dengan perubahan gen yang teridentifikasi berhubungan dengan varian bawaan pada gen MLH1. Beberapa ratus varian gen MLH1 telah ditemukan pada orang dengan kondisi ini. Sindrom Lynch meningkatkan risiko berbagai jenis kanker, khususnya kanker kolorektal. Orang dengan sindrom Lynch juga memiliki peningkatan risiko kanker endometrium (lapisan rahim), ovarium, lambung, usus kecil, saluran kandung empedu, saluran kemih bagian atas, dan otak. Pada usia 75 tahun, risiko terkena salah satu kanker ini adalah 80 persen pada wanita dan 70 persen pada pria dengan varian gen MLH1 (Jaballah-Gabteni et al., 2019; Bhattarai et al., 2020).

Hingga saat ini, masih sangat sedikit penelitian yang mengeksplorasi hubungan ekspresi MLH1 dengan aspek-aspek klinikopatologis pada penderita kanker kolorektal. Kemajuan ilmu pengetahuan dalam mengenali berbagai varian mutasi genetik telah membuka era baru dalam pemahaman klinisi mengenai evolusi kanker. Hal ini memfasilitasi pengembangan dan implementasi terapi yang spesifik dan personalized untuk mengoptimalkan hasil pengobatan. Biomarker molekuler kanker, sebagai indikator yang bisa diidentifikasi pada setiap individu, mewakili spektrum dari risiko kanker, prevalensi, hingga prognosis pasien. Biomarker ini diharapkan akan memberikan

wawasan yang dapat mendukung klinisi dalam menentukan strategi terapi yang paling efektif untuk setiap pasien. Oleh karena itu, penulis terinspirasi untuk mendalami dan meneliti relevansi klinis ekspresi MLH1 dan hubungannya dengan aspek klinikopatologis pada penderita kanker kolorektal di RSUP Wahidin Sudirohusodo.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, peneliti menyusun rumusan masalah penelitian ini berupa: Apakah terdapat hubungan antara ekspresi MLH1 dengan Aspek klinikopatologis pada penderita kanker kolorektal di RSUP Wahidin Sudirohusodo.

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui hubungan antara ekspresi MLH1 dengan Aspek klinikopatologis pada penderita kanker kolorektal di RSUP Wahidin Sudirohusodo.

2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui hubungan ekspresi MLH1 dengan jenis kelamin pada kanker kolorektal.
- b. Mengetahui hubungan ekspresi MLH1 dengan usia pada kanker kolorektal.
- c. Mengetahui hubungan ekspresi MLH1 dengan golongan darah A,B dan AB pada kanker kolorektal.
- d. Mengetahui hubungan ekspresi MLH1 dengan lokasi tumor pada kanker kolorektal.
- e. Mengetahui hubungan ekspresi MLH1 dengan stadium pada kanker kolorektal.
- f. Mengetahui hubungan ekspresi MLH1 dengan grading pada kanker kolorektal.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

a. Pendidikan

1. Memberikan informasi mengenai hubungan ekspresi MLH1 dengan Aspek klinikopatologis pada kanker kolorektal.
2. Menambah khasanah ilmu pengetahuan mengenai peran MLH1 dalam insidensi kanker kolorektal

b. Penelitian

Memberikan informasi berupa data bio marker tentang ekspresi MLH1 dengan Aspek klinikopatologis pada kanker kolorektal yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai hubungan gabungan 4 protein Mismatch repair (MMR) dengan aspek klinikopatologis pada kanker kolorektal.

c. Pelayanan:

1. Meningkatkan kewaspadaan dan pemantauan pada penderita KKR dengan ditemukannya ekspresi MLH1 positif pada aspek klinikopatologis tertentu.
2. Sebagai data dasar pertimbangan dalam upaya pengelolaan kanker kolorektal sehingga pengelolaan kanker kolorektal di masa yang akan datang akan lebih baik dan tepat guna.
3. Sebagai data dasar untuk penelitian lebih lanjut pada kanker kolorektal di bidang biologi molekuler pada penderita kanker kolorektal, sehingga bisa dijadikan dasar untuk penelitian modalitas terapi kanker yang lebih baik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KANKER KOLOREKTAL

Kanker kolorektal adalah malignansi yang berasal dari jaringan usus besar, terdiri dari kolon (bagian terpanjang dari usus besar) dan atau rektum (bagian kecil terakhir dari usus besar sebelum anus). Kanker kolorektal disebabkan oleh adanya proliferasi sel epitel kelenjar yang abnormal pada kolon dan rektum. Ada tiga jenis utama kanker kolorektal yaitu sporadis, herediter, dan colitis-associated. Di seluruh dunia jumlah kasus kanker kolorektal meningkat dari hari ke hari. Faktor lingkungan dan genetik menyumbang peranan terhadap risiko kanker kolorektal (Hossain et al., 2022).

2.1.1 EPIDEMIOLOGI KANKER KOLOREKTAL

Kanker kolorektal adalah kanker terbanyak ketiga yang pada pria dan kanker terbanyak kedua pada wanita. Ada lebih dari 1,9 juta kasus baru kanker kolorektal pada tahun 2020 saja (Bray et al., 2015; Arnold et al., 2017). Kanker kolorektal merupakan penyebab kematian terbanyak kedua akibat kanker, dimana mencakup hampir 935.000 kematian akibat kanker (Arnold et al., 2017). Kanker ini merupakan salah satu kanker yang insidensinya meningkat sebesar 11% dari seluruh diagnosis kanker (Wong et al., 2021). WHO memprediksi hingga tahun 2040 insidensi kanker kolorektal akan meningkat hingga 630/o dan mortalitas kanker kolorektal akan meningkat hingga 730/o (Morgan et al., 2020). Serupa dengan kondisi di Indonesia, angka mortalitas kanker kolorektal di tahun 2020 mencapai 7,9% dengan angka insidensi sebesar 8,60/o. (Jeo and Subrata, 2020; Sung et al., 2021). Studi pada faskes tingkat tersier di Indonesia menyebutkan dari tahun 2002 hingga 2011 kanker kolorektal menyumbang sebanyak 73,7% dari seluruh keganasan gastrointestinal (Makmun et al., 2014).

Menurut data GLOBOCAN 2020 terdapat variasi geografis yang luas dalam

kejadian dan kematian kanker kolorektal di antara berbagai negara di dunia (World Health Organisation, 2020; Ferlay et al., 2021). Diamati peningkatan insidensi dan mortalitas KKR yang paling terjadi di negara-negara indeks pembangunan manusia (HDI) menengah ke tinggi. Negara maju memiliki risiko tertinggi kanker usus besar. Obesitas, gaya hidup, konsumsi daging merah, alkohol dan tembakau dikaitkan sebagai faktor pemicu kanker kolorektal (Bray et al., 2015; Arnold et al., 2017; World Health Organisation, 2020; Ferlay et al., 2021; Wong et al., 2021). Data menarik dari studi yang dilakukan pada tahun 2017 menunjukkan kejadian kanker kolorektal meningkat di 10 dari 36 negara yang dianalisis (semuanya di Asia dan Eropa); India mengalami peningkatan paling signifikan, diikuti oleh Polandia (Arnold et al., 2017; Ferlay et al., 2021). Ke-10 negara ini memiliki skor HDI menengah ke tinggi. Sedangkan enam negara mengalami yang penurunan kejadian kanker usus besar; negara-negara ini memiliki skor HDI tinggi dengan Amerika Serikat menjadi negara yang mengalami penurunan paling signifikan (Ferlay et al., 2021; Wong et al., 2021).

Di Makassar, setiap tahun terjadi peningkatan kasus kanker kolorektal. Pada tahun 2005 ditemukan sebanyak 39 kasus, tahun 2006 sebanyak 59 kasus, tahun 2007 sebanyak 52 kasus, tahun 2008 sebanyak 151 kasus, tahun 2009 sebanyak 114 dan tahun 2010 sebanyak 124 kasus. Berdasarkan data yang diperoleh dari Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar pada tahun 2005 kanker kolorektal menempati urutan keempat dari seluruh keganasan, tahun 2006 tercatat 107 kasus kanker kolorektal dan menempati urutan ketiga, tahun 2008 ditemukan 272 kasus kanker kolorektal dan menempati urutan kedua setelah kanker payudara (Lusikooy, 2017).

2.1.2 FAKTOR RISIKO

Berbagai faktor diketahui berperan dalam perkembangan kanker kolorektal. Seseorang berisiko tinggi mengalami kanker kolorektal jika memiliki riwayat kanker atau kerabat yang menderita kanker, riwayat polip kolon, inflammatory bowel disease, diabetes mellitus dan kolesistektomi. Faktor gaya hidup juga berperan

penting sebagai etiologi kanker kolorektal. Studi-studi terdahulu menunjukkan pasien overweight dan obesitas, kurang aktivitas fisik, memiliki kebiasaan merokok, konsumsi alkohol dan pola diet yang tidak sehat (diet rendah serat, buah-buahan, sayuran, kalsium dan diet tinggi daging merah dan daging olahan) berisiko tinggi mengalami kanker kolorektal. Selain itu, mikrobiota usus, usia, jenis kelamin dan ras serta faktor sosial ekonomi diketahui juga mempengaruhi risiko kanker kolorektal (Sawicki et al., 2021).

1. Riwayat Keluarga dan Kelainan Genetik

Riwayat kanker kolorektal dalam keluarga secara signifikan meningkatkan risiko kanker kolorektal. Fenomena ini dikaitkan dengan faktor genetik yang diwariskan dan faktor gaya hidup. Informasi yang relevan saat menganamnesis kanker kolorektal antara lain meliputi (Sawicki et al., 2021):

1. Jarak generasi dari kerabat ke individu yang berisiko
2. Usia saat kerabat tingkat pertama menderita kanker kolorektal
3. Jumlah anggota keluarga yang didiagnosis menderita kanker kolorektal
4. Riwayat neoplasma lain dalam keluarga (seperti endometrium, ovarium dan saluran kemih, pankreas)
5. Riwayat kanker pada pasien sendiri

Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) atau sindrom Lynch, dan *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) adalah dua sindrom genetik penting dalam kanker kolorektal. HNPCC, penyakit autosomal dominan, disebabkan oleh mutasi pada gen perbaikan kesalahan DNA, terutama gen MLH1 dan MSH2, serta mutasi lain seperti MSH6, MLH3, TGBR2, PMS1, dan PMS2. Individu dengan HNPCC menghadapi risiko 20o/o mengembangkan kanker kolorektal pada usia 50 tahun, meningkat menjadi 80o/o pada usia 85 tahun. FAP, juga penyakit autosomal dominan, diakibatkan oleh mutasi pada gen supresor tumor APC. Pasien FAP sering mengalami pembentukan ratusan hingga ribuan polip kolon pada masa remaja, yang berpotensi berkembang menjadi kanker kolorektal, biasanya sebelum usia 35-40

tahun. Sindrom terkait lainnya yang meningkatkan risiko kanker kolorektal termasuk sindrom Peutz- Jeghers, poliposis juvenil, sindrom tumor hamartoma PTEN, dan MUTYH- associated polyposis (MAP) (Win et al., 2012; Sehgal et al., 2014; Kolligs, 2016; Rawla, Sunkara and Barsouk, 2019; Valle et al., 2019).

2. Inflammatory Bowel Disease (Penyakit Crohn; Kolitis Ulserati

Inflammatory Bowel Disease (IBD) menempati peringkat ketiga sebagai faktor risiko terbanyak untuk kanker kolorektal, setelah HNPCC dan FAP. IBD adalah sekelompok penyakit kronis dan sulit untuk disembuhkan yang mempengaruhi sistem kekebalan saluran pencernaan. Hal ini kemudian menyebabkan terjadinya proses peradangan yang tidak terkendali. Dua bentuk utama IBD adalah penyakit Crohn dan kolitis ulserativa. Etiologi IBD belum diketahui dengan jelas dan diperkirakan perkembangan IBD adalah hasil interaksi dari faktor genetik, imunologi dan lingkungan (Hnatyszyn et al., 2019; Rawla, Sunkara and Barsouk, 2019). Individu dengan riwayat IBD memiliki risiko kanker kolorektal sebesar dua hingga enam kali lebih tinggi dibandingkan dengan individu yang sehat. Risiko kanker kolorektal meningkat seiring dengan durasi IBD, kelainan anatomis, dan keparahan penyakit (Amersi, Agustin and Ko, 2006).

3. Polip Kolon

Polip kolon, baik non-neoplastik maupun neoplastik (adenomatous), berisiko menjadi kanker. Sekitar 95% kanker kolorektal berasal dari polip adenomatous. Risiko transformasi menjadi malignan meningkat dengan ukuran polip, tingkat displasia, dan usia (Thelin and Sikka, 2015). Polip besar, displasia tingkat tinggi, dan usia lanjut adalah faktor prognostik untuk transformasi polip menjadi kanker. Sekitar 40% pasien berusia di atas 50 tahun dengan satu atau lebih polip adenomatous, disarankan menjalani operasi untuk mengangkat polip tersebut sebelum transisi kanker (Amersi, Agustin and Ko, 2006; Shussman and Wexner, 2014)

4. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, yang ditandai dengan hiperglikemia kronis, diakibatkan oleh kelainan sekresi dan fungsi insulin. Diabetes meningkatkan risiko

kanker kolorektal, terutama diabetes tipe 2 (Ma et al., 2018; Pang et al., 2018). Penderita diabetes tipe 2 memiliki risiko dua hingga tiga kali lebih besar terkena kanker kolorektal dibandingkan dengan populasi non-diabetes (Peeters et al., 2015). Hiperinsulinemia dan peradangan kronis diketahui berkontribusi pada kankerogenesis (Brzacki et al., 2019).

5. Riwayat Kolesistektomi

Kolesistektomi, adalah prosedur pengangkatan kandung empedu dan diketahui meningkatkan risiko kanker kolorektal. Perubahan sekresi dan komposisi asam empedu setelah kolesistektomi bisa mengganggu membran sel mukosa kolon, memicu kerusakan DNA dan meningkatkan risiko karsinoma kolon (Zhang et al., 2017). Dengan tidak adanya kantong empedu, ada aliran empedu yang terus menerus mengalir ke usus, yang kemudian akan menghasilkan peningkatan biotransformasi bakteri dari asam empedu menjadi asam empedu sekunder. Asam empedu sekunder berpotensi menghasilkan spesies oksigen dan nitrogen reaktif, yang berisiko mengganggu membran sel dan menginduksi kerusakan DNA serta apoptosis pada sel mukosa kolon, yang meningkatkan risiko berkembangnya karsinoma kolon (Ajouz, Mukherji and Shamseddine, 2014; Nguyen et al., 2018).

6. Diet tinggi daging merah dan olahan

Menurut International Agency for Research on Cancer Group, Konsumsi daging merah dan olahan, dikategorikan oleh International Agency for Research on Cancer sebagai karsinogenik bagi manusia, meningkatkan risiko kanker kolorektal. Pemrosesan daging menghasilkan senyawa seperti hidrokarbon aromatik polisiklik dan N-nitroso, yang berpotensi menyebabkan mutasi DNA dan memicu kanker (Rawla, Sunkara and Barsouk, 2019). Perlu diingat juga bahwa konsumsi daging merah dan daging olahan tinggi lemak berkontribusi terhadap obesitas, resistensi insulin dan peningkatan sekresi asam empedu, yang juga berperan sebagai surfaktan agresif untuk mukosa dan meningkatkan risiko terkena kanker kolorektal (Aran et al., 2016).

7. Diet rendah serat, buah dan sayuran

Diet rendah serat dan buah serta sayuran meningkatkan risiko kanker kolorektal. Serat makanan membantu mengurangi waktu transit usus, mengencerkan karsinogen, dan merangsang mikrobiota usus yang bermanfaat, memberikan efek protektif terhadap kanker (Gandomani et al., 2017).

8. Diet rendah kalsium, vitamin D dan produk susu

Menurut Menurut World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, tingginya konsumsi produk susu (khususnya susu) dapat menurunkan risiko berkembangnya kanker kolorektal. Efek perlindungan yang disarankan dari produk susu disebabkan oleh kandungan kalsiumnya. Kalsium diketahui dapat mengikat asam empedu sekunder dan asam lemak sehingga mengurangi perannya dalam mengubah mukosa usus dan akan menghambat potensi karsinogeniknya. Selain itu, kalsium juga diketahui menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis sel tumor serta mengurangi pola mutasi yang berbeda pada proto-onkogen KRAS (Keum and Giovannucci, 2019).

Selain kalsium, komponen susu lainnya seperti vitamin D juga memainkan peran yang bermanfaat dalam menghambat perkembangan KKR. Fungsi utama vitamin D adalah pemeliharaan homeostasis kalsium dengan meningkatkan penyerapannya di usus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vitamin D mengubah ekspresi berbagai gen yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan, proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel epitel. Selain itu, vitamin D juga menunjukkan efek antiinflamasi, peningkatan fungsi kekebalan tubuh dan menghambat angiogenesis. Karena fakta bahwa sumber utama vitamin D bagi manusia adalah paparan sinar matahari pada kulit, ada beberapa penelitian untuk menentukan apakah distribusi kejadian kanker kolorektal bergantung pada jumlah cahaya alami. Studi menunjukkan bahwa angka kematian akibat kanker kolorektal lebih tinggi pada wilayah utara Amerika Serikat dan Eropa. Diasumsikan bahwa populasi yang tinggal di garis lintang yang lebih tinggi terkena lebih sedikit dosis ultraviolet-B matahari sehingga mensintesis lebih sedikit vitamin D dan karena hal ini, mereka memiliki risiko lebih tinggi terhadap kanker kolorektal (Guraya, 2014).

9. Kegemukan, Obesitas, dan Kurang Aktivitas Fisik

Obesitas dan kegemukan meningkatkan risiko kanker kolorektal. Jaringan adiposa berlebihan berkontribusi pada perubahan hormonal dan sekresi sitokin yang memicu kanker. Diperkirakan bahwa risiko kanker kolorektal keseluruhan meningkat sebesar 30% untuk setiap kenaikan berat badan lima kilogram (Rawla, Sunkara and Barsouk, 2019). Jaringan adiposa pada orang yang kelebihan berat badan/obesitas melepaskan banyak hormon dan sitokin (seperti leptin, resistin, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7 dan IL-8), yang diketahui memiliki efek mitogenik pada sel epitel, menghambat apoptosis sel, meningkatkan stres oksidatif, menekan respon imun dan mengurangi aktivitas aksis IGF-1 dan telah dikaitkan dengan perkembangan dan progresi kanker (Carr et al., 2018).

Kurangnya aktivitas fisik dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker kolorektal. Diperkirakan bahwa orang yang tidak aktif secara fisik memiliki risiko 50% lebih tinggi terkena kanker kolorektal dibandingkan dengan orang yang paling aktif secara fisik. Olahraga teratur memiliki manfaat protektif, termasuk meningkatkan fungsi imun dan mengurangi peradangan (Keum and Giovannucci, 2019).

10. Merokok dan Konsumsi Alkohol

Merokok meningkatkan risiko kanker kolorektal. Asap tembakau mengandung bahan kimia karsinogenik yang merusak DNA dan memicu perkembangan polip menjadi kanker (Sawicki et al., 2021). Merokok diketahui menyebabkan hingga 12% kematian akibat kanker kolorektal (Ahmed et al., 2014). Asupan alkohol adalah salah satu kontributor utama perkembangan kanker kolorektal. Diperkirakan konsumsi 2-3 minuman setiap hari meningkatkan risiko kanker kolorektal sekitar 20%, sedangkan minum lebih dari tiga minuman beralkohol meningkatkan risiko ini sekitar 40%. Individu yang terbiasa minum empat gelas atau lebih setiap hari meningkatkan kemungkinan terkena kanker kolorektal hingga 52%. Alkohol menghasilkan spesies oksigen reaktif dan asetaldehida mutagenik yang berpotensi merusak DNA (Sawicki et al., 2021).

11. Mikrobiota usus

Perubahan mikrobiota usus berkontribusi pada perkembangan kanker kolorektal. Perubahan komposisi dan fungsi mikrobiota normal dapat menyebabkan kerusakan DNA, peradangan, dan gangguan fungsi penghalang usus. Akibatnya, homeostasis mikrobiota usus yang terganggu berkontribusi pada pengembangan lingkungan mikro yang menguntungkan untuk mengembangkan kanker kolorektal (Cheng, Ling and Li, 2020).

12. Usia

Sekitar 90% dari semua kasus baru kanker kolorektal terjadi pada individu berusia di atas 50 tahun. Usia yang lanjut dianggap sebagai salah satu faktor paling signifikan yang mempengaruhi risiko berkembangnya kanker kolorektal. Diperkirakan bahwa orang di atas usia 65 tahun memiliki risiko tiga kali lebih besar terkena kanker kolorektal dibandingkan dengan mereka yang berusia 50- 64 tahun dan 30 kali lebih besar risikonya dibandingkan orang berusia 25-49 tahun. Usia rata-rata saat diagnosis kanker kolorektal adalah 68 pada pria dan 72 tahun pada wanita. Saat ini, dianjurkan untuk memulai skrining kanker kolorektal pada orang dewasa berusia lebih dari 50 tahun (Rawla, Sunkara and Barsouk, 2019).

13. Jenis Kelamin dan Ras

Menurut American Cancer Society, risiko dan prognosis kanker kolorektal bervariasi berdasarkan jenis kelamin dan ras, dengan pria dan individu kulit hitam non-Hispanik mengalami risiko lebih tinggi. Alasan perbedaan jenis kelamin tidak sepenuhnya dipahami, dianggap mungkin terkait dengan perbedaan paparan faktor risiko (misalnya alkohol dan tembakau), pola makan dan hormon seks. Insiden kanker kolorektal juga bervariasi secara substansial berdasarkan ras (Sawicki et al., 2021).

14. Faktor Sosial Ekonomi

Status sosial ekonomi yang rendah berkaitan dengan risiko kanker yang lebih tinggi, dikaitkan dengan akses terbatas ke perawatan kesehatan berkualitas dan gaya hidup yang kurang sehat (Carethers and Doubeni, 2020).

2.2 KARSINOGENESIS KANKER KOLOREKTAL

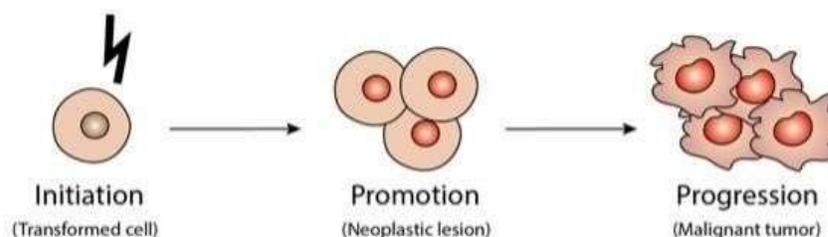
Kanker merupakan produk dari proses yang melibatkan interaksi kompleks antara faktor lingkungan dan endogen. Kanker biasanya dimanifestasikan oleh proliferasi sel yang tidak terkontrol yang telah mempertahankan perubahan yang dapat diwariskan. Penemuan bahwa banyak karsinogen berinteraksi dengan DNA dan dengan demikian mengubah genotipe, yaitu urutan DNA spesifik dari informasi yang disandakan, penting untuk pengembangan teori karsinogenesis saat ini. Juga telah dipelajari bahwa pewarisan mutasi tunggal (yaitu, gen dengan DNA yang diubah) mungkin tidak cukup untuk menghasilkan kanker. Dalam tubuh manusia, jutaan sel berisiko, dan banyak di antaranya yang terbukti memiliki lesi DNA; namun, hanya sedikit sel yang menyebabkan tumor ganas. Ketika DNA rusak, tubuh merespons dengan mekanisme seluler untuk memperbaiki atau menghilangkan sel yang menyimpang melalui mekanisme pengawasan kekebalan. Proses ini memberikan perlindungan terhadap mutagen dan karsinogen eksogen dan endogen. Mutasi seluler seringkali merupakan tahap awal dalam proses multistage (Basu., 2018).

Karsinogenesis adalah proses di mana dua atau lebih senyawa, bila diberikan secara bersamaan, meningkatkan risiko perkembangan tumor. Dalam beberapa kasus, cocarcinogen tidak karsinogenik dengan sendirinya, tetapi meningkatkan potensi karsinogenik dari suatu pemicu. Dalam kasus lain, kedua senyawa bersifat karsinogenik dengan sendirinya, tetapi bersama-sama menghasilkan respons yang lebih besar dari yang diharapkan berdasarkan aditif sederhana. Karsinogen berbeda dari promotor menurut definisi karena promotor diberikan setelah inisiator dan biasanya tidak karsinogenik saja. Beberapa senyawa mungkin merupakan cocarcinogens dan promotor. Namun, tidak semua promotor tumor adalah kokarsinogen dan tidak semua kokarsinogen adalah promotor tumor, menunjukkan bahwa promosi dan kokarsinogenesis dilakukan dengan mekanisme yang berbeda (Huang et al., 2020)

Terjadinya kanker kolorektal terdiri dari tahapan inisiasi, promosi dan progresi. Inisiasi melibatkan kerusakan genetik ireversibel yang mempengaruhi sel

epitel mukosa usus untuk transformasi neoplastik berikutnya. Pada fase promosi, sel yang diinisiasi bermultiplikasi dan menyebabkan pertumbuhan abnormal (kanker). Sebaliknya, sel kanker jinak berubah menjadi ganas selama tahap perkembangan dan memperoleh fitur agresif dan potensi metastatik. Bagian penting dari langkah karsinogenesis kanker kolorektal adalah adanya lesi prekursor jinak, yang didefinisikan sebagai polip. Jenis lain dari lesi yang diidentifikasi dalam lumen kolon adalah polip adenomatous dan polip serrated, yang merupakan prekursor langsung dari sebagian besar kanker. Adenoma stadium advanced (diameter >1 cm) dengan atau tanpa diversitas memiliki risiko perkembangan kanker yang lebih besar (30 hingga 50%) dibandingkan adenoma non-advanced (1%). Selain itu, adenoma stadium advanced memiliki risiko transisi menjadi kanker yang lebih tinggi dan meningkat seiring bertambahnya usia (Gandomani et al., 2017).

Karsinogenesis secara eksperimental telah dibuktikan sebagai proses bertingkat dalam sel jaringan hewan tertentu, termasuk kulit, paru-paru, hati, dan kandung kemih. Proses ini diyakini terjadi pada banyak tumorigenesis manusia juga. Menurut teori saat ini, setidaknya tiga tahap (inisiasi, promosi, dan perkembangan) terbukti pada banyak kanker yang diinduksi secara eksperimental. Tahapan ini bersifat fenomenologis, dan mekanisme aksinya tidak dipahami dengan baik. Perbedaan antara tahapan telah ditentukan secara eksperimental. Setiap tahap tampaknya dipengaruhi oleh beberapa faktor eksogen dan endogen, seperti usia, jenis kelamin, diet, aktivitas metabolisme, dan dosis serta jenis zat xenobiotik yang terpapar organisme (Huang et al., 2020)



Gambar1. Tahap Karsinogenesis

2.2.1. TAHAP INISIASI

Inisiator adalah mutagen yang bertindak baik secara langsung maupun tidak langsung dengan membentuk spesies elektrofilik yang berinteraksi dengan dan memodifikasi struktur DNA, atau merusak urutan DNA, tetapi tidak dengan sendirinya menyebabkan pembentukan tumor. Inisiasi diyakini menyebabkan lesi yang menetap dalam waktu lama, seperti yang ditunjukkan oleh Van Duuren et al. yang menunjukkan bahwa kulit tikus yang diinisiasi lebih dari 1 tahun sebelum pengobatan dengan phorbol ester masih sangat rentan terhadap induksi tumor. Dengan demikian, langkah inisiasi dianggap tidak dapat diubah. Selain mendemonstrasikan hal ini, Boutwell menunjukkan bahwa dosis berulang dari suatu inisiator dapat meningkatkan jumlah tumor yang dihasilkan (Ferreira et al., 2017).

Promotor adalah zat yang biasanya tidak menyebabkan respons karsinogenik dengan sendirinya tetapi menghasilkan respons karsinogenik bila diterapkan dalam beberapa dosis setelah satu dosis subkarsinogenik dari suatu inisiator. Urutan administrasi temporal ini hanya dapat dibuktikan di laboratorium; Perbedaan seperti itu sulit untuk ditunjukkan pada manusia, yang menerima paparan lingkungan secara simultan terhadap berbagai jenis bahan kimia. Beberapa promotor juga dapat menunjukkan aktivitas awal yang lemah pada dosis tinggi. Tidak seperti inisiator, promotor tidak membentuk spesies elektrofilik yang berinteraksi dengan DNA. Beberapa bukti menunjukkan bahwa promosi itu sendiri melibatkan beberapa tahapan dan dimungkinkan untuk mengkarakterisasi seorang promotor sebagai promotor lengkap atau tahap pertama atau kedua. Efek dari promotor tahap pertama dianggap reversibel; yaitu, jika pemberian promotor dihentikan, respons karsinogenik tidak dihasilkan. Pemberian promotor tahap kedua menghasilkan efek yang tidak dapat diubah. Senyawa yang mampu bertindak baik sebagai inisiator dan promotor dalam jaringan yang sama didefinisikan sebagai karsinogen lengkap (utuh). Kebanyakan bahan kimia yang tampaknya berfungsi sebagai pemicu tampaknya merupakan karsinogen lengkap (Ferreira et al., 2017).

2.2.2 TAHAP PROGRESI

Periode di mana tahapan yang tidak jelas mengarah dari tumor jinak ke tumor ganas disebut progresi. Transformasi sel neoplastik menjadi tumor ganas selama tahap ini dapat melibatkan beberapa langkah, seperti aktivasi, penyimpangan kromosom, interaksi antara sel tumor dan pertahanan inang dan berbagai proses seleksi. Progresi dapat dianggap sebagai proses yang dinamis, karena tumor dapat terus meningkat dalam derajat keganasan dan heterogenitas (Ferreira et al., 2017).

2.3 DASAR MOLEKULAR KANKER KOLOREKTAL

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 ajuvan. 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 2. Multifaktor Karsinogenesis Kolorektal (Markowitz SD and Bertagnolli MM2009).

Kejadian molekul 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

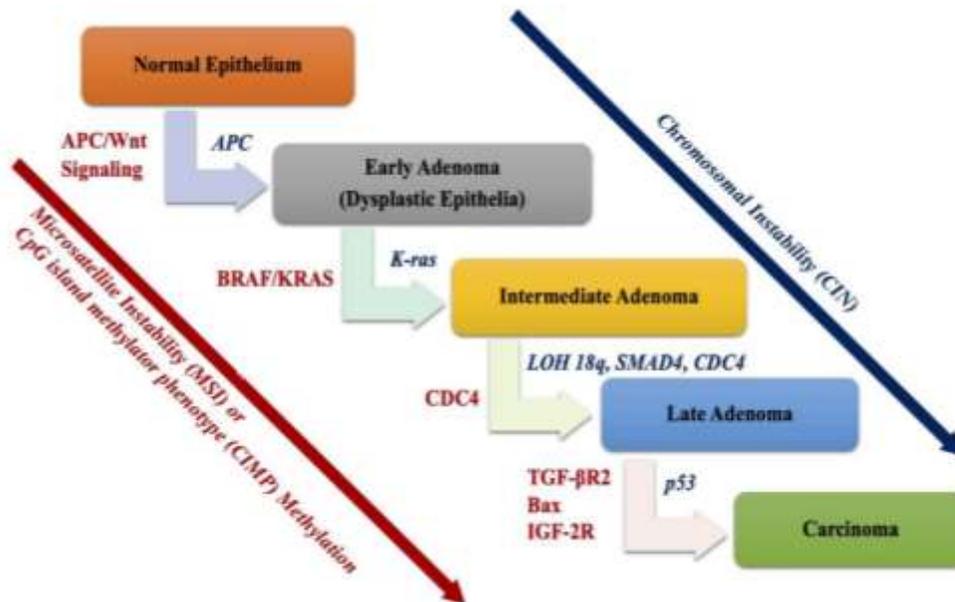
Transformasi epitel kolon normal menjadi lesi prakanker (adenoma) dan akhirnya menjadi karsinoma invasif memerlukan akumulasi mutasi genetik baik somatik (didapat) dan/atau germline (diwariskan). Teori karsinogenesis kolon menampilkan evolusi mutasi klonal yang memberikan keuntungan kelangsungan hidup *survival-immortal* sel dan memungkinkan untuk mengembangkan lebih banyak mutasi yang memberikan ciri khas kanker lainnya seperti proliferasi, invasi, metastasis, dan lain-lain. Bukti klinis telah menunjukkan bahwa KKR sering muncul dari polip adenomatosa yang biasanya mengalami perubahan displastik dalam periode 10 hingga 15 tahun sebelum berkembang menjadi karsinoma invasif, dan deteksi dini pengangkatan polip akan mengurangi kejadian KKR. Bukti baru telah mengungkap bahwa polip hamartomatous dan bergerigi dapat menyebabkan KKR (Bien et al., 2019).

2.4 JALUR MOLEKULER KANKER KOLOREKTAL

Terdapat tiga jalur molekuler utama yang terkait dengan KKR: ketidakstabilan kromosom (CIN), ketidakstabilan mikrosatelit (MSI), dan fenotipe metilasi pulau CpG (CIMP). Jalur ketidakstabilan kromosom adalah mutasi yang menyebabkan ketidakseimbangan onkogen dengan tumor suppressor yang dapat terlihat seperti pada mutasi pada adenomatous polyposis coli (APC), ciri khas FAP. Sel dengan defisiensi DNA *mismatch repair* (dMMR), umumnya MLH1 atau MSH2, mengakumulasi kesalahan dalam genom yang selanjutnya akan diulangi menyebabkan tingkat ketidakstabilan mikrosatelit (MSI-H) yang tinggi, ciri khas sindrom Lynch. Hipermetilasi DNA CpG dapat mengaktifkan atau membungkam ekspresi gen tertentu, masing-masing BRAF dan MLH1. Mutasi somatik onkogen sporadis (RAS, SRC, MYC) telah terlibat dalam KKR, RAS yang paling relevan secara klinis. Varian mutasi RAS (HRAS, KRAS, NRAS) ditemukan pada 50% kasus

sporadis KKR, saat ini sedang dieksploitasi pada skrining KKR dengan pengujian feses-DNA, tidak adanya respon terapi bertarget reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR) dan potensi agen target langsung .

Urutan adenokarsinoma telah dijelaskan jauh sebelumnya, pada tahun 1980, ketika transformasi epitel kolorektal normal menjadi adenoma dan, akhirnya, untuk tumor invasif dan metastasis telah dijelaskan . Ada tiga besar jalur yang terlibat (Gambar 3).



Gambar 3. Model genetik multistep untuk urutan adenokarsinoma kolorektal. Ada tiga jalur yang mengatur urutan adenokarsinoma: ketidakstabilan kromosom (CIN), ketidakstabilan mikrosatelit (MSI), dan metilasi pulau CpG fenotip (CIMP) hipermetilasi.

2.4.1 Jalur Ketidakstabilan Kromosom (CIN)

Ketidakstabilan kromosom mengacu pada peningkatan yang signifikan dalam keuntungan atau kerugian baik seluruh atau sebagian besar kromosom dan merupakan kelainan ketidakstabilan genetik yang paling sering terjadi pada KKR. CIN ditemukan pada sekitar 85% transisi adenokarsinoma dan ditandai dengan aktivasi

onkogen (KRAS dan BRAF), inaktivasi TSGs (APC dan TP53), dan hilangnya heterozigositas untuk lengan panjang kromosom 18 (18q LOH), dengan demikian, mempromosikan tumorigenesis KKR (Malki et al., 2020).

Menurut model genetik multistep yang didefinisikan oleh Fearon dan Vogelstein, langkah pertama mencakup pembungkaman APC, diikuti oleh mutasi KRAS onkogenik di tahap adenomatosa, dan, akhirnya, penghapusan kromosom 18q dan inaktivasi TP53 terjadi selama transisi ke keganasan (Gambar 1). Tambahan, baru-baru ini, penyimpangan genetik pada TGF- β R dan PI3KCA ditemukan terlibat dalam model urutan adenokarsinoma (Malki et al., 2020).

Selanjutnya, hibridisasi genomik komparatif berbasis array dan nukleotida tunggal teknik polimorfisme telah mengidentifikasi beberapa kehilangan alel yang sering berulang dari semua lengan kromosom di KKR yang mencakup kerugian pada lengan kromosom 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p, dan 22q [3,22-24]. Di sisi lain, keuntungan kromosom diidentifikasi pada kromosom 7 dan lengan kromosom 1q, 8q, 12q, 13q, dan 20q [3,22-24]. Alelik kehilangan atau perolehan materi menunjukkan keberadaan kandidat TSG atau onkogen, masing-masing sehingga memungkinkan pertumbuhan sel bermutasi, yang mengarah ke transformasi sel normal menjadi kanker (Malki et al., 2020).

2.4.2 Jalur Ketidakstabilan *Mismatch Repair* (MSI)

Jenis lain dari ketidakstabilan genom pada KKR adalah ketidakstabilan *Mismatch Repair* (MMR), karakteristik khas sel kanker. MSI adalah ciri khas dari HNPCC atau Lynch sindrom dan terjadi pada >95% kasus HNPCC. Namun, di sebagian besar kasus sporadis KKR, mekanisme yang mendasari CIN tetap terjadi dan MSI hanya terdiri dari 15-20% dari semua kasus KKR (Maliki et al., 2020).

Subset tumor dengan lokus tidak stabil pada penanda 30% didefinisikan sebagai "Microsatellite High" (MSI-H), subset tumor dengan 10-29% lokus tidak stabil diklasifikasikan "Microsatellite Low" (MSI-L), dan "mikrosatelit stabil" (MSS) ditandai tanpa penanda yang tidak stabil. Pada kanker dengan MSI-H,

penyisipan/penghapusan kecil menghasilkan mutasi frameshift di dalam saluran berulang di daerah pengkodean TSG atau onkogen, yang selanjutnya berkontribusi pada tumorigenesis. Mori dkk. melakukan skrining genomik skala besar dari pengkodean wilayah mikrosatelit dan ditemukan mutasi pada sembilan lokus (TGF- β R2, Bax, MSH3, ActRIIB, SEC63, AIM2, NADH-ubiquinone oxidoreductase, COBLL1, dan EBP1) pada >20% tumor. TGF- β R2 adalah lokus dan ketidakstabilan yang paling sering bermutasi di saluran poli-adenin TGF- β R2 hadir di sekitar 85% dari MSI-H KKR. Selain itu, Bax, gen lain yang sering bermutasi, ditemukan memiliki mutasi frameshift dalam urutan poliguanin di hampir 50% dari MSI-H KKR, mengakibatkan inaktivasi Bax dan penghambatan apoptosis (Maliki et al., 2020).

MSI jarang ditemukan pada polip, kecuali pada sindrom Lynch. Lebih-lebih lagi, individu dengan sindrom Lynch sering berkembang menjadi MSI KKR karena mutasi germline di salah satu gen MMR (MLH1, MSH2, MSH6, dan PMS2); mutasi pada MLH1 atau MSH2 yang menyebabkan peningkatan risiko (70-80%) terkena kanker, sementara mutasi pada MSH6 atau gen PMS2 memiliki risiko yang relatif lebih rendah (25-60%) dari perkembangan kanker. Sebaliknya, KKR MSI sporadis sering kali menunjukkan hilangnya aktivitas MMR karena MLH1 membungkam dengan metilasi DNA menyimpang (Maliki et al., 2020).

Selanjutnya, menurut studi pemodelan dan tidak adanya kanker usus besar pada individu dengan mutasi germline biallelic pada gen MMR menunjukkan bahwa kurangnya aktivitas MMR tidak cukup untuk memicu pembentukan polip. Relevan dengan dampak klinisnya, ada data tidak langsung yang cukup besar bahwa polip yang timbul sebagai akibat dari hilangnya aktivitas MMR memiliki interval transisi dari polip ke kanker kolorektal; polip dapat berkembang menjadi MSI KKR dalam waktu kurang dari 2-3 tahun. Bukti yang menunjukkan kurangnya kemajuan MMR dan onset MSI menginduksi perkembangan dan progresi tumor didasarkan pada fakta bahwa MSI umumnya diamati pada polip yang berdekatan dengan kanker dan jarang terjadi pada polip yang tidak lanjut. Diketahui bahwa MSI KKR sporadis

berkorelasi dengan jalur neoplasia bergerigi dan umumnya membawa mutasi BRAFV600E, sebaliknya, sindrom Lynch muncul dari Mutasi germline gen MMR dan kekurangan BRAF yang bermutasi (Maliki et al., 2020).

Secara klinis, KKR yang bermutasi BRAF berkorelasi dengan prognosis yang buruk dan kelangsungan hidup secara keseluruhan (OS) dibandingkan dengan penyakit tipe wild BRAF. Selanjutnya, sebuah penelitian menunjukkan bahwa Pasien KKR yang bermutasi BRAF memiliki OS terburuk dibandingkan dengan pasien yang membawa mutasi RAS (KRAS) dan (NRAS). Juga, mutasi pada BRAF merupakan faktor prognostik negatif pada stadium penyakit II dan III. Sebaliknya, sebuah penelitian baru-baru ini, melakukan meta-analisis di 1164 Pasien KKR non-metastatik MSI-H dan menunjukkan bahwa mutasi BRAF V600E terkait dengan OS terburuk, tetapi tidak untuk kambuhnya penyakit. Selain itu, meta-analisis lain dalam pasien yang menjalani reseksi metastasis hati menunjukkan bahwa setelah metastasektomi, OS paling buruk untuk KKR metastatik yaitu yang bermutasi BRAF. Juga telah terungkap bahwa, KKR nonV600E BRAF-mutasi (BRAF kodon 594 dan 596) memiliki prognosis yang lebih baik dibandingkan ke KKR yang bermutasi BRAF; Tumor BRAF 594 dan 496 stabil mikrosatelit, rektal, nonmusinosa tanpa penyebaran peritoneum dan memiliki OS yang jauh lebih lama dibandingkan dengan Tumor bermutasi BRAF V600E. Demikian pula, penelitian lain pada pasien KKR menunjukkan, dibandingkan dengan tumor bermutasi BRAF V600E, tumor bermutasi BRAF non-V600E hadir pada populasi yang lebih muda, tumor tingkat rendah dan OS median secara signifikan lebih lama dibandingkan dengan pasien mutan V600E BRAF dan tipe wild BRAF (Wang et al., 2018).

2.4.3 Jalur Fenotipe Metilator Pulau CpG (CIMP)

Metilasi DNA adalah penambahan gugus metil ke sitosin di 50 posisi yang dikatalisis oleh DNA methyltransferases melalui hubungan kovalen dalam dinukleotida CG urutan dalam wilayah promotor, disebut transkripsi CpG. Dalam keadaan normal sel, sebagian besar situs CpG sangat termetilasi sementara pulau

CpG, biasanya terletak di daerah promotor gen, tidak termetilasi. Namun, setelah inisiasi kanker, hipermetilasi dalam wilayah promotor dapat menyebabkan inaktivasi gen penekan tumor, sementara hipometilasi global dikaitkan dengan ketidakstabilan genom. dan penyimpangan kromosom. Ketidakstabilan epigenetik di KKR ditunjukkan sebagai hipermetilasi lokus yang mengandung pulau CpG dan ini biasanya disertai dengan hipometilasi DNA global. Perubahan pola metilasi dapat mempengaruhi hampir semua jalur pensinyalan, termasuk TP53, TGF β /SMAD, Wnt, NOTCH dan reseptor tirosin kinase yang terlibat dalam regulasi siklus sel, regulasi transkripsi, stabilitas DNA, apoptosis, adhesi sel-sel, angiogenesis, invasi sel dan metastasis (Magzoub et al., 2019).

Banyak gen diidentifikasi untuk dimetilasi dan dibungkam dalam KKR, beberapa umumnya yang termetilasi termasuk APC, MLH1, MGMT, SFRP1, SFRP2, CDKN2A, TIMP3, VIM, SEPT, CDH1 dan HLTF. Selain itu, ada subset KKR yang berbeda, yang dikenal sebagai CpG fenotipe metilasi pulau (CIMP); Tumor CIMP sering membawa mutasi BRAFV600E. CIMP selanjutnya disubklasifikasikan berdasarkan genetik dan epigenetik terintegrasi ketidakstabilan menjadi CIMP2, CIMP-rendah, dan CIMP-tinggi. Profil metilasi DNA mengungkapkan bahwa sekitar 20% dari KKR adalah tumor CIMP; tumor CIMP secara signifikan berkorelasi dengan usia, jenis kelamin wanita, lokasi kolon proksimal, serta mutasi MSI, KRAS dan BRAF. Penanda CIMP yang paling umum digunakan adalah MLH1, p16, MINT1, MINT2 dan MINT31. Penanda tambahan termasuk CACNA1G, CRABP1, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, HIC1 dan IGFBP3 untuk identifikasi CIMP positif (Magzoub et al., 2019).

Meskipun, ekspresi DNA methyltransferases yang diregulasi (DNMT3B atau DNMT1) dikaitkan dengan CIMP, mekanisme yang mendasari yang mempromosikan CIMP masih belum diketahui. Salah satu mekanisme dasar yang masuk akal didasarkan pada pembungkaman hambatan yang menghambat metilasi pulau CpG yang biasanya tidak termetilasi. mekanisme lain yang disarankan adalah perubahan dalam struktur kromatin dan keadaan modifikasi histon dari histon H3 mengarah pada

deteksi metilasi DNA yang menyimpang di lokus yang mendapatkan perubahan ini. Sementara, PTEN, sebuah TSG, menunjukkan pengurangan metilasi tingkat, gen TWIST1 dibungkam oleh metilasi promotor di KKR. Selain dari semua mekanisme hipermetilasi DNA yang disebutkan di atas, hipometilasi DNA global sering terjadi pada urutan berulang termasuk pengulangan LINE-1, retrotransposon, intron dan gurun gen (Magzoub et al., 2019).

2.5 Mismatch Repair (MMR)

MMR adalah proses pasca-replikasi seluler yang menjaga homeostasis DNA dan sebagai hasilnya adalah jaminan evolusioner dari stabilitas genomik (Kunkel, 2009). Pekerjaan utama dari MMR DNA adalah untuk memperbaiki mismatch spontan dan loop insersi-deletion loops (indels) yang sebagian besar dihasilkan selama replikasi DNA. Ketika MMR kurang, laju mutasi sel meningkat begitu juga dengan perubahan panjang urutan dalam mikrosatelit (Schmidt dan Pearson, 2016). Variasi dalam panjang mikrosatelit berulang disebut sebagai mikrosatelit instability (MSI), jenis ketidakstabilan genomik yang khas untuk sel tumor. Selain MSI, sel tumor dapat mengandung jenis ketidakstabilan utama lainnya yang berkontribusi pada heterogenitas tumor yang disebut chromosomal instability, atau CIN. CIN umumnya terkait dengan perubahan kromosom struktural dan numerik (Bach et al., 2019) yang disebabkan oleh kesalahan dalam segregasi kromosom karena penempelan abnormal kromosom dalam metafase mitosis. Tingginya tingkat kesalahan segregasi kromosom, yang khas untuk kanker, pada akhirnya mengarah pada aneuploidi pada keturunan sel kanker (Sansregret dan Swanton, 2017). Selain perubahan numerik seperti pada level kromosom keseluruhan, aberrasi kromosom struktural seperti translokasi, delesi, duplikasi segmental, dan amplifikasi gen juga merupakan bagian dari CIN. Perubahan dalam onkogen umum dan gen penekan tumor juga penyebab CIN, terutama oleh adanya mutasi somatik. Contoh terkenal adalah mutasi dalam onkogen myc dan ras, dan gen penekan tumor APC. Kinerja polimerase yang menjalankan sintesis DNA di garpu replikasi tidak bebas dari kesalahan. Frekuensi

kesalahan yang dilakukan oleh polimerase DNA eukariotik diperkirakan sekitar satu kesalahan untuk setiap 105 nukleotida (Kunkel, 2009; Bebenek dan Ziuzia-Graczyk, 2018), yang berarti bahwa sekitar 100.000 kesalahan terjadi selama setiap fase S seluler. Baris pertahanan pertama terhadap frekuensi mutasi yang tinggi seperti itu adalah aktivitas proofreading enzim polimerase. Meskipun polimerase DNA memastikan aktivitas lektur semacam itu oleh domain mereka sendiri, beberapa mutasi yang diperkenalkan masih dapat lolos tanpa terlihat dan perlu diperbaiki melalui garis pertahanan kedua—ekspresi gen terkait MMR. Sistem perbaikan ketidakcocokan awalnya ditemukan dalam *Escherichia coli* (Su dan Modrich, 1986; Modrich, 2016). Studi-studi awal menunjukkan bahwa ketidakcocokan dalam molekul DNA menginduksi reaksi perbaikan setelah transformasi ke dalam sel *E. coli*. Kemudian, gen-gen yang terlibat dalam *E. coli* ditemukan, yaitu, MutS, MutL, MutH, dan *uvrD* (protein perbaikan ultraviolet D) (Hanaoka dan Sugawara, 2016; Modrich, 2016). Telah ditunjukkan bahwa inaktivasi salah satu dari empat gen *E. coli* yang terlibat dalam perbaikan meningkatkan laju mutasi pada bakteri antara 50 hingga 100 kali lipat. Studi perbandingan pada organisme model seperti bakteri dan *Saccharomyces cerevisiae* menunjukkan bahwa mekanisme MMR dasar dan protein sangat terjaga dalam hampir semua organisme mulai dari bakteri hingga manusia (Jiricny, 2013). Secara singkat menjelaskan mekanisme dasar MMR pada prokariota, penting untuk memahami bahwa protein MMR biasanya bekerja sebagai homodimer dan bahwa untai DNA komplementer sel utuh digunakan sebagai template untuk koreksi untai yang salah. Produk protein dari gen MutS memulai mesin MMR dan bertanggung jawab untuk deteksi ketidaksesuaian dalam DNA double helix (Sameer et al., 2014). Saat mengenali lesi, protein mengalami perubahan konfirmasi, untuk dapat mengikat sebagai homodimer dan membentuk ikatan stabil dengan basa yang tidak sesuai. Setelah ini tercapai, MutS merekrut MutL ke kompleks MutS-tidak sesuai. Lebih tepatnya, MutL bertindak sebagai mediator antara MutS dan protein efektor MMR downstream lainnya, seperti MutH dan UvrD (Sameer et al., 2014). Sebagai anggota keluarga endonuklease restriksi tipe II, MutH diperlukan untuk

eksisi untai. Enzim ini biasanya memotong di situs GATC hemimetilasi yang menghasilkan “nick” dalam DNA yang memastikan eksisi DNA beruntai tunggal yang mengandung ketidaksesuaian. Metilasi DNA memastikan bahwa untai DNA yang baru bermutasi akan lebih disukai dipotong. Perlu dicatat bahwa mekanisme diskriminasi untai pada eukariota masih belum pasti. Akhirnya, *uvrD* adalah helikase DNA yang diperlukan untuk membuka untai DNA selama rekombinasi dan bekerja dari nick yang terbentuk oleh MutH.

MMR sangat penting untuk memastikan integritas genom. Fungsi utama dari jalur MMR adalah untuk mengidentifikasi dan memperbaiki ketidakcocokan basa-basa dan penyisipan/penghapusan (indels) yang dihasilkan selama replikasi dan rekombinasi DNA. Konsekuensi langsung dari defisiensi MMR adalah ketidakstabilan (yaitu, keuntungan atau kerugian) di daerah mikrosatelit dari genom, yang terdiri dari pengulangan pasangan basa mono dan di-nukleotida. Secara klinis, integritas MMR sering dinilai menggunakan pewarnaan imunohistokimia (IHC) untuk ekspresi empat protein MMR, dengan hilangnya ekspresi MLH1/PMS2 dan/atau MSH2/MSH6 menjadi pola paling umum yang terlihat pada tumor dengan defisiensi MMR. Integritas MMR juga dapat dinilai dengan analisis fragmen untuk MSI di lima wilayah genom yang telah ditentukan (yaitu, panel Bethesda), atau, baru-baru ini, dengan sekuensing generasi berikutnya (NGS). Sementara MSI-H bersama dengan mutasi tumor, diukur pada profil tumor NGS telah muncul sebagai biomarker yang relevan untuk memprediksi respons tumor terhadap *immune checkpoint inhibitors* (ICI), penelitian telah menunjukkan mutasi tumor bervariasi secara signifikan di antara tumor MSI-H, dan dampak independen dan gabungannya pada respons terhadap ICI masih dalam penyelidikan. (Salem et al., 2020).

Mikrosatelit adalah rangkaian pengulangan mononukleotida, dinukleotida, atau nukleotida orde tinggi (panjang satuan berkisar antara 1 hingga 6 basa), yang tersebar di seluruh genom manusia, paling sering sebagai (CA)_n (Yamamoto dan Imai 2015; Findeisen et al., 2005). Situs-situs ini rentan terhadap kesalahan replikasi DNA sebagai akibat dari selip DNA polimerase, dengan memasukkan basa tambahan

ketika terjadi slip pada untai yang disintesis atau dengan menghilangkan basa ketika terjadi selip pada untai cetakan, yang menyebabkan untaian DNA yang tidak cocok (Kunkel dan Erie 2005). ; Drake et al., 1998). Diperkirakan bahwa replikasi DNA polimerase epsilon dan delta membuat kesalahan kira-kira sekali untuk setiap 104 dan 105 nukleotida yang mereka polimerisasi (Chang et al., 2001). Jadi, setiap kali sel membelah, sekitar 100.000 kesalahan polimerase terjadi, yang harus diperbaiki melalui tindakan gabungan aktivitas proofreading polimerase epsilon dan delta (Bebenek dan Kunkel 2004). Namun, beberapa kesalahan selalu lolos dari proofreading, dan secara efektif dikoreksi melalui sistem mismatch repair (MMR) (Arana dan Kunkel 2010), yang bertanggung jawab atas pengawasan dan koreksi kesalahan selama replikasi, perbaikan, dan rekombinasi DNA

MLH1, MutS protein homologue 2 (MSH2), MutS homologue 6 (MSH6) dan PMS1 homologue 2 (PMS2) adalah protein utama yang terlibat dalam sistem MMR ini, dan mereka berinteraksi sebagai heterodimer: MSH2 berpasangan dengan MSH6 atau MSH3 (membentuk MutS α dan Kompleks MutS β , masing-masing), dan pasangan MLH1 dengan PMS2 atau MLH3 (masing-masing membentuk kompleks MutL α , MutL β atau MutL γ) (Li 2008; Jiricny 2006b, 2006a). Kompleks yang dibentuk oleh MutS dan MutL pada akhirnya bertanggung jawab untuk pengenalan ketidakcocokan dan loop penyisipan-penghapusan (Genschel et al., 1998) dan perekrutan berikutnya dari kompleks MLH1/PMS2 akan menurunkan regangan yang bermutasi dan memulai resintesis. Pasien dengan defek pada salah satu komponen ini atau, pada gen hulu MSH2 yang mengkodekan molekul adhesi sel epitel (EPCAM), akan mengembangkan "fenotipe mutator" dengan banyak mutasi frameshift dalam mikrosatelit pengkode dan non-kode dan pada genetik lainnya. lokus di luar mikrosatelit. Hal ini menghasilkan fenotipe tinggi ketidakstabilan mikrosatelit (MSI-H), terkait erat dengan karsinogenisitas tumor herediter dan sporadis (Eshleman dan Markowitz 1996). Kanker MSI-H dikaitkan dengan peningkatan 100 hingga 1.000 kali lipat tingkat mutasi mutasi frameshift dan missense. Mutasi frameshift dalam urutan pengkodean dapat menimbulkan produk protein yang berubah dalam tumor,

yang disebut 'neoantigens'. Neoantigen ini unik untuk tumor dan dengan demikian berpotensi dikenali sebagai molekul 'non-diri' oleh sistem kekebalan.³⁶

2.6 IMPLIKASI KLINIS PEMAHAMAN JALUR MOLEKULER KANKER KOLOREKTAL

Prognosis dan pilihan terapeutik untuk pasien KKR dikaitkan dengan tahap di mana mereka pertama kali didiagnosis. Sementara KKR tahap awal sering disembuhkan dengan pembedahan saja, KKR yang lebih lanjut atau metastatik umumnya memerlukan kemoterapi tambahan atau terapi target, baik sendiri atau sebagai pengobatan kombinasi. Deteksi dini KKR menjadi penting untuk mengurangi insidensi dan mortalitas penyakit. Lebih lanjut, karena heterogenitasnya, manfaat dari kemoterapi adjuvan untuk pasien KKR stadium II dan III sangat bervariasi. Dengan demikian, mengidentifikasi penanda prognostik molekuler yang mampu mengenali pasien dengan KKR lebih mungkin untuk kambuh atau mendapat manfaat dari kemoterapi adjuvan dapat meningkatkan prognosis dan membantu dalam pemilihan terapi yang sesuai, dan selanjutnya hasil umum (Nguyen et al., 2018).

Sekarang secara luas diketahui bahwa perubahan tertentu pada tingkat molekuler mendukung onset KKR, progresi dan metastasis. Beberapa mutasi yang diketahui dianggap terkait dengan hasil akhir pasien yang lebih buruk dan / atau kegagalan respons terhadap terapi tertentu. Pasien dengan mutasi TP53 yang tidak aktif, misalnya, berada pada peningkatan risiko kematian dibandingkan dengan rekan mereka, tetapi mutasi ini tampaknya tidak mempengaruhi hasil kemoterapi. Namun, adanya mutasi KRAS somatik telah dianggap sebagai prediktor resistensi terhadap terapi anti-EGFR. Demikian status KRAS mutasi. Saat ini digunakan dalam pengaturan klinis untuk memprediksi efektivitas terapeutik KKR sebelum kemoterapi untuk menghindari efek yang tidak diinginkan dan biaya medis. APC adalah gen lain yang umumnya terpengaruh yang mutasinya umumnya muncul pada tahap awal perkembangan KK. Khususnya, risiko KKR untuk pasien dengan FAP, yang dimulai dengan mutasi germline pada satu alel gen APC adalah ~ 100% pada usia 40 tahun.

Oleh karena itu, mutasi APC dianggap sebagai penanda diagnostik yang baik untuk mengidentifikasi individu yang berisiko terkena KKR (Nguyen et al., 2018).

Mayoritas (~ 75%) KKR dengan MSI adalah kasus sporadis yang disebabkan oleh hilangnya aktivitas MMR DNA akibat metilasi promotor gen MLH1, sedangkan 25% kasus lainnya diklasifikasikan sebagai sindrom Lynch yang disebabkan oleh mutasi germline pada gen MMR (Gambar 2). Umumnya, MSI terdeteksi di awal kehidupan pada pasien dengan sindrom Lynch (<50 tahun) dibandingkan dengan kasus sporadis (> 65 tahun). Secara khusus, KKR dengan MSI lebih mungkin terjadi di kolon proksimal. Bukti menunjukkan bahwa MSI adalah biomarker prognostik yang menguntungkan untuk KKR. Namun, peran prediktifnya untuk respons terhadap agen kemoterapi, termasuk 5-fluorouracil (5-FU) bertentangan. Beberapa penelitian menunjukkan kurangnya manfaat kemoterapi adjuvan berbasis 5-FU pada pasien KKR dengan tumor MSI, sementara yang lain melaporkan efek menguntungkan. Des Guetz et al melakukan meta-analisis yang melibatkan 3.690 pasien dari tujuh penelitian berbeda, dan melaporkan bahwa kemoterapi memiliki efek menguntungkan di antara MSS, tetapi tidak pada pasien MSI-H. Selain itu, tingkat kelangsungan hidup pasien MSI-H yang lebih baik lebih disebabkan oleh prognosis yang lebih baik daripada manfaat kemoterapi. Temuan ini menyarankan bahwa MSI dapat dianggap sebagai penanda prediktif kemoresistensi dan bahwa pasien dengan KKR dengan MSI dapat terhindar dari pengobatan adjuvan. Status MSI di antara pasien dengan KKR, dengan demikian, sangat berharga dalam prognosis dan terapi KKR, dan harus dievaluasi secara menyeluruh dengan melakukan analisis reaksi berantai polimerase menggunakan panel Bethesda dan / atau pewarnaan imunohistokimia untuk protein DNA MMR, termasuk MLH1 dan MSH2, untuk berkontribusi dalam pengambilan keputusan pengobatan terkait pemberian kemoterapi (Nguyen et al., 2018).

Beberapa kelompok telah menggunakan profil ekspresi gen untuk mengklasifikasikan KKR, dan untuk mengidentifikasi gen yang terkait dengan prognosis dan prediksi hasil penyakit. De Sousa et al menggunakan strategi klasifikasi tanpa pengawasan yang melibatkan > 1.100 orang dengan kanker usus

besar dan mendefinisikan tiga sub tipe utama kanker usus besar. Dua sub tipe dikaitkan dengan dua subset kanker usus besar yang dikarakterisasi dengan baik, yaitu kelompok CIN dan MSI. Sub tipe ketiga sebagian besar adalah MSS dan sebagian tumpang tindih dengan kelompok CIMP, dan dikaitkan dengan prognosis yang buruk dan resistansi terhadap terapi anti-EGFR. Menggunakan pendekatan serupa, Sadanandam et al mendefinisikan enam sub tipe KKR yang relevan secara klinis dengan menghubungkan profil ekspresi gen mereka dengan respons klinis yang sesuai terhadap cetuximab. Pasien dengan tumor sub tipe mirip batang dan sub tipe inflamasi, dengan kelangsungan hidup bebas penyakit yang buruk dan sedang, menunjukkan peningkatan respons terhadap kombinasi regimen kemoterapi FOLFIRI (5-FU dengan irinotecan) dalam pengaturan adjuvan atau metastasis, sedangkan transit-amplifying- dan goblet. tumor - seperti-sub tipe, dengan prognosis yang jauh lebih baik, tampaknya tidak mendapat manfaat dari pengobatan ini. Namun, sub tipe penguat transit sensitif cetuximab dan sub tipe penguat transit tahan cetuximab dapat diobati secara efisien dengan cetuximab atau penghambat cMET, masing-masing, dalam pengaturan metastasis. Meskipun ada hubungan yang signifikan antara status MSI dan sub tipe tertentu, sub tipe berbasis tanda tangan transkripsi memungkinkan penyempurnaan yang lebih baik dan memberikan wawasan untuk pengembangan terapi sub tipe spesifik, yang, pada gilirannya, dapat berkontribusi pada manajemen penyakit ini yang lebih efektif (Nguyen et al., 2018).

2.7 Pemeriksaan MSI dan MMR

Staging TNM tetap menjadi standar emas untuk menginformasikan prognosis pasien dan memandu manajemen setelah reseksi untuk kanker kolorektal non-metastasis (KKR). Meskipun pada stadium penyakit yang sama, pasien KKR dapat menunjukkan variabilitas yang cukup besar dalam hasil klinis yang mungkin terkait dengan heterogenitas tumor molekuler. Oleh karena itu, klasifikasi molekuler KKR dapat mengidentifikasi subkelompok pasien dengan risiko kekambuhan dan kematian serta pendekatan terapi yang dapat dipersonalisasi pada masing-masing pasien. (Kawakami et al., 2015)

The Cancer Genome Atlas (TCGA) telah mengungkapkan karakterisasi komprehensif genom dari 224 tumor kolorektal kanker dan pasangan normal. Di antara KKR yang diteliti, 16% ditemukan mengalami hipermutasi, dan 77% dari tumor ini menunjukkan ketidakstabilan mikrosatelit frekuensi tinggi (MSI-H) yang umumnya terkait dengan hipermetilasi dan gen MLH1. Tumor hipermutasi yang tersisa terutama ditandai dengan adanya mutasi pada jalur MMR somatik dan pada polimerase epsilon (POLE). Sistem DNA MMR memperbaiki kesalahan pasangan basa-basa yang dimasukkan ke dalam mikrosatelit selama sintesis DNA untuk menjaga stabilitas genom. Mikrosatelit adalah urutan pendek yang berulang-ulang yang terjadi di seluruh genom dan digunakan sebagai penanda defisiensi (d) MMR. Sistem DNA MMR terdiri dari 4 gen MMR dan protein yang dikodekan (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Inaktivasi MLH1 dan MSH2 menyumbang lebih dari 90% kasus dMMR. Defisiensi MMR menghasilkan produksi protein nonfungsional yang terpotong atau hilangnya protein yang menyebabkan MSI. Oleh karena itu, dMMR sering dianalisis dengan menguji hilangnya protein MMR atau untuk MSI menggunakan uji berbasis PCR. (Kawakami et al., 2015)

MMR sangat penting untuk memastikan integritas genom. Fungsi utama dari jalur MMR adalah untuk mengidentifikasi dan memperbaiki ketidakcocokan basa-basa dan penyisipan/penghapusan (indels) yang dihasilkan selama replikasi dan rekombinasi DNA. Konsekuensi langsung dari defisiensi MMR adalah ketidakstabilan (yaitu, keuntungan atau kerugian) di daerah mikrosatelit dari genom, yang terdiri dari pengulangan pasangan basa mono dan di-nukleotida. Secara klinis, integritas MMR sering dinilai menggunakan pewarnaan imunohistokimia (IHC) untuk ekspresi empat protein MMR, dengan hilangnya ekspresi MLH1/PMS2 dan/atau MSH2/MSH6 menjadi pola paling umum yang terlihat pada tumor dengan defisiensi MMR. Integritas MMR juga dapat dinilai dengan analisis fragmen untuk MSI di lima wilayah genom yang telah ditentukan (yaitu, panel Bethesda), atau, baru-baru ini, dengan sekuensing generasi berikutnya (NGS). Sementara MSI-H bersama dengan mutasi tumor, diukur pada profil tumor NGS telah muncul sebagai biomarker

yang relevan untuk memprediksi respons tumor terhadap *immune checkpoint inhibitors* (ICI), penelitian telah menunjukkan mutasi tumor bervariasi secara signifikan di antara tumor MSI-H, dan dampak independen dan gabungannya pada respons terhadap ICI masih dalam penyelidikan. (Salem et al., 2020).

2.7.1 Pemeriksaan MSI

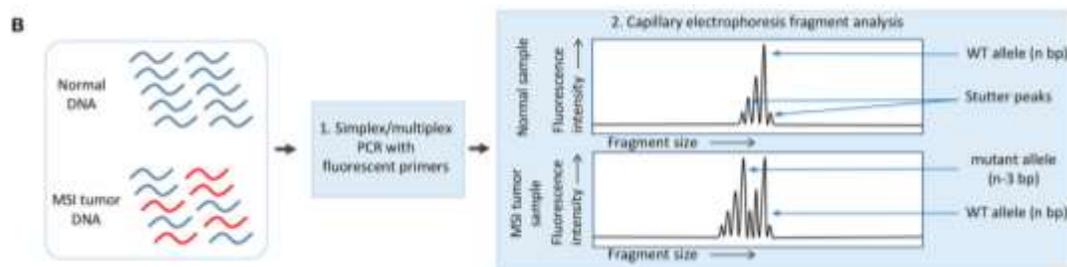
Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Imunoistokimia (IHC) adalah dua metode berbasis biologi molekuler yang digunakan secara rutin untuk pengujian MSI klinis. Analisis MSI-PCR digunakan untuk mendeteksi ketidakstabilan pada pengulangan mikrosatelit sedangkan MMR IHC digunakan untuk mendeteksi kurangnya ekspresi satu atau lebih protein MMR (Aaltonen et al., 1998; Cairns et al., 2010).³⁶

MSI dideteksi dengan amplifikasi PCR dari pengulangan mikrosatelit tertentu, yang ketidakstabilannya ditentukan dengan membandingkan panjang pengulangan nukleotida dalam sel tumor dan sel normal dari mukosa normal yang berdekatan. Daerah ini diamplifikasi di dalam tumor dan jaringan normal melalui PCR multipleks fluoresen dan ukurannya dinilai dengan elektroforesis kapiler (Bacher et al., 2004; Berg et al., 2000).³⁶

MSI telah dijelaskan dan dicirikan secara luas pada kanker kolorektal di mana 15-20% tumor menyajikan fenotipe MSI yang berkorelasi dengan kelangsungan hidup pasien yang lebih baik. Selain itu, 3% kanker kolorektal MSI muncul dalam konteks sindrom bawaan disebut *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) atau sindrom Lynch, di mana mutasi konstitusional gen MMR mengarah pada peningkatan risiko kejadian kanker yang membutuhkan manajemen khusus. Sindrom kedua yang lebih parah yang disebut *Constitutional Mismatch Repair Deficiency* (CMMRD) disebabkan oleh germline bi-allelic mutasi dari salah satu dari empat gen MMR (MLH1, MSH2, MSH6, atau PMS2), dan ditandai dengan munculnya multiple neoplasia termasuk kanker kolorektal pada masa kanak-kanak. (Baudrin et al., 2018)

Deteksi MSI awalnya dilakukan di kolorektal kanker dengan menggunakan PCR pada penanda tertentu yang diikuti dengan elektroforesis gel poliakrilamida dan autoradiografi, atau metode sidik jari berdasarkan primer PCR (AP-PCR) di mana primer dengan dipilih sekuens yang digunakan dalam PCR yang dicirikan oleh beberapa siklus keketatan diikuti oleh beberapa siklus keketatan yang lebih tinggi, dan dikombinasikan dengan elektroforesis untuk pemisahan fragmen. Di beberapa laboratorium, deteksi MSI dilakukan dengan pewarnaan perak atau etidium bromida dari gel poliakrilamida setelahnya elektroforesis daripada autoradiografi. (Baudrin et al., 2018)

Metode tersebut, memiliki kekurangan yaitu memakan waktu dan memberikan akurasi ukuran yang rendah, sehingga digantikan oleh pendekatan yang lebih baru yang menjadi standar emas untuk deteksi MSI. Pendekatan ini menggabungkan PCR dengan fluorescent primer dan elektroforesis kapiler menggunakan sequencer DNA yang memungkinkan analisis fragmen pada resolusi basis tunggal (Gambar 4). Prosedur ini juga telah diperbaiki oleh multiplexing PCR untuk memungkinkan amplifikasi 2-5 mikrosatelit penanda dan identifikasi otomatis ukuran alel. (Baudrin et al., 2018)



Gambar 4. Fragmen elektroforesis kapiler analisis (FA)

- *The National Cancer Institute Workshop* menyepakati lima penanda mikrosatelit yang diperlukan untuk menentukan MSI yang mencakup dua penanda mononukleotida – BAT25/26 dan tiga penanda dinukleotida – D2S123, D5S346, dan D17S250. Interpretasi profil membutuhkan perbandingan dengan DNA normal dari setiap pasien. Metode molekuler

alternatif berdasarkan secara eksklusif pada penanda mononukleotida kuasi-monomorfik dikembangkan untuk menghindari analisis pencocokan DNA normal. Metode ini telah terbukti lebih spesifik dan sensitif daripada panel NCI asli. (Kawakami et al., 2015)

- Berdasarkan status MSI, KKR dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok: MSI-H, jika dua atau lebih dari lima penanda mikrosatelit menunjukkan ketidakstabilan; MSI-L (MSI frekuensi rendah), jika hanya satu dari lima penanda yang menunjukkan ketidakstabilan; dan microsatellite stable (MSS) jika tidak ada penanda yang menunjukkan ketidakstabilan. (Kawakami et al., 2015)

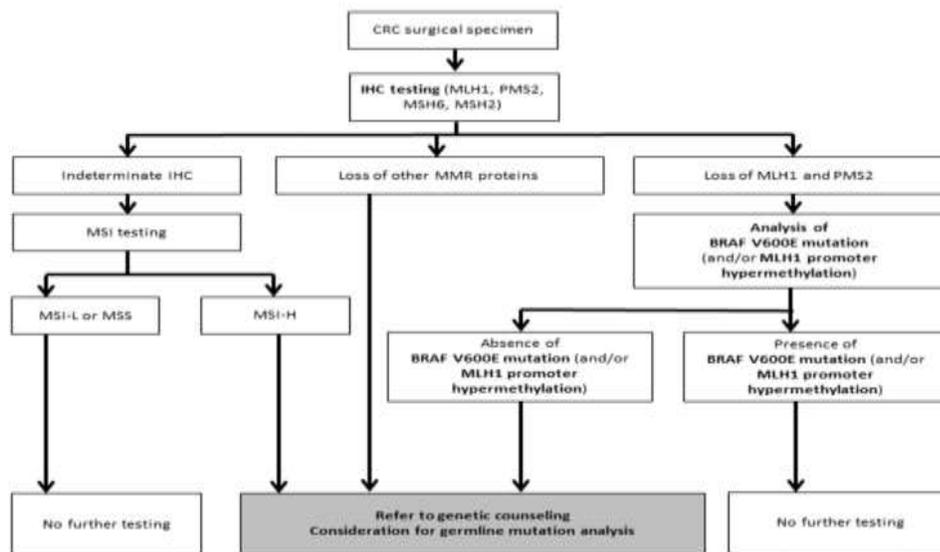
2.7.2 Pemeriksaan MMR

Analisis ekspresi protein MMR dengan Imunohistokimia (IHC) merupakan tes alternatif yang tersedia secara luas dengan keuntungan tidak memerlukan laboratorium molekuler, dan kemampuan untuk mengidentifikasi gen yang terpengaruh dengan mendeteksi kehilangan produk proteinnya. (Kawakami et al., 2015)

- Keuntungan lain dari pengujian IHC adalah hilangnya produk gen *mismatch* spesifik (MLH1, MSH2, MSH6, dan PMS2) dapat mengarahkan pengujian germline ke gen spesifik tersebut, dan membantu dalam identifikasi pasien dengan Lynch Sindrom.
- Pengujian MSI dan IHC merupakan pelengkap, dan hilangnya ekspresi protein MMR oleh IHC telah terbukti sangat sesuai dengan pengujian MSI berbasis DNA dengan sensitivitas yang baik (>90%) dan spesifisitas yang sangat baik (100%).
- Hanya hilangnya ekspresi protein hMLH1 yang telah dijelaskan pada KKR yang terjadi sporadis. Protein MLH1 dan PMS2 sering hilang bersama-sama, menunjukkan hilangnya fungsi MLH1 yang umumnya karena pembungkaman epigenetik atau mutasi germline. Hilangnya protein PMS2 yang terisolasi

umumnya menunjukkan mutasi germline PMS2 yang mendasarinya.

- Pada KKR dengan hilangnya ekspresi protein MLH1, pengujian untuk mutasi pada onkogen BRAF adalah pendekatan yang paling hemat biaya untuk mengkonfirmasi kasus sporadis dan umumnya mengecualikan LS yang dapat mendukung penggunaan strategi ini untuk skrining LS. Pasien dengan BRAF yang tidak bermutasi kemudian akan menjalani tes germline untuk mutasi pada gen MLH1 yang diduga berubah (Gambar 5).
- Protein MSH2 dan MSH6 sering hilang secara bersamaan. Hilangnya protein MSH2 atau MSH6 terisolasi pada pengujian IHC memiliki spesifisitas tinggi untuk mutasi germline gen ini yang mengarah ke diagnosis LS (Gambar 5). Juga, hilangnya protein MSH2 dapat disebabkan oleh mutasi germline pada gen EPCAM daripada gen MSH2.
- Tumor yang menunjukkan hilangnya protein MMR dapat secara kolektif disebut sebagai dMMR dan dianggap sebagai MSI-H, sedangkan tumor dengan protein MMR utuh dapat diklasifikasikan sebagai pMMR diharapkan stabil mikrosatelit (MSS) atau MSI rendah (MSI-L).



Gambar 5. Algoritma Untuk Evaluasi Sistematis Pada Pasien Dengan Kanker Kolorektal.

2.8. Immunohistochemistry (IHC)

Analisis IHC protein MMR (MLH1, MSH2, MSH6 dan PMS2) umumnya digunakan sebagai alternatif MSI untuk mendeteksi defisiensi MMR dalam praktik klinis dan dapat menginformasikan pengujian genetik untuk LS (Baudhuin et al., 2005). IHC untuk protein MMR memiliki karakteristik kinerja yang sebanding dengan pengujian MSI dan tingkat kesesuaian yang tinggi, dengan spesifisitas 100% untuk tumor MSI-H dan 96,7% untuk tumor MSS dan MSI-L (Remo et al., 2016; Wang et al., 2017). Kurangnya ekspresi satu atau lebih protein MMR mengarah pada diagnosis defisiensi MMR (dMMR) sambil menyarankan gen penyandi mana yang kemungkinan besar bermutasi atau tidak aktif. Faktanya, protein MLH1 dan MSH2 stabil tanpa pasangan dimernya (masing-masing PMS2 dan MSH6), tetapi kebalikannya umumnya tidak benar. Akibatnya, tumor dengan tidak adanya ekspresi MLH1 dan PMS2, tetapi mempertahankan ekspresi MSH2 dan MSH6, mewakili ekspresi MLH1, di mana kurangnya ekspresi PMS2 adalah konsekuensi dari defisit MLH1 (baik oleh hipermetilasi promotor atau mutasi). Di sisi lain, jika mutasi terjadi pada PMS2 atau MSH6, hanya protein yang terpengaruh yang akan hilang (namun, MSH2 dapat hilang ketika kedua mitra pengikatnya, MSH6 dan MSH3, hilang) (Vilar dan Gruber 2010).³⁶

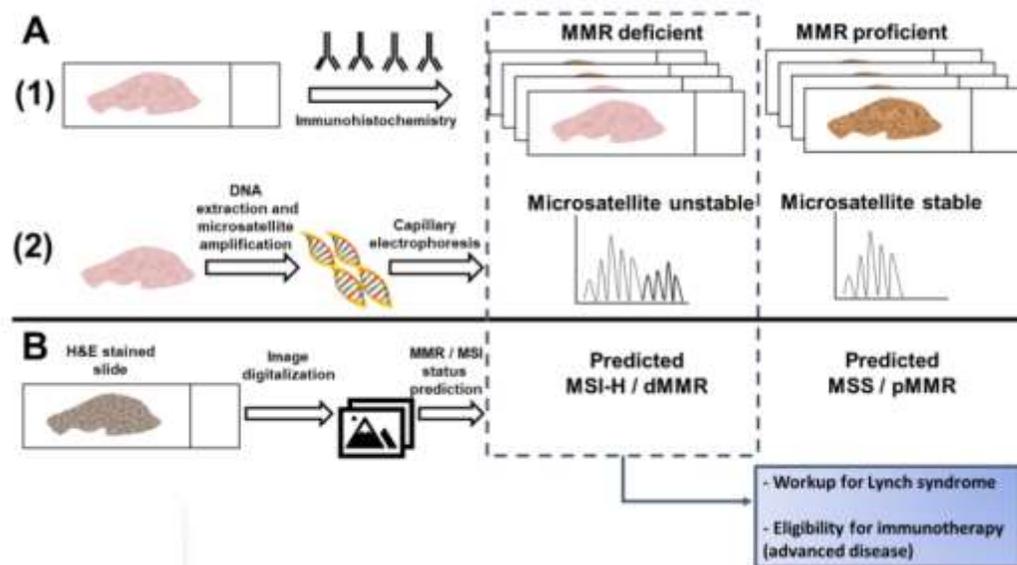
Fitur-fitur ini memungkinkan seseorang untuk menentukan dengan IHC gen MMR mana yang kemungkinan bermutasi (atau termetilasi), suatu keuntungan yang tidak ada pada pengujian MSI (Shia 2008; Zhang 2008). Analisis MSI juga bisa lebih memakan waktu dan tenaga daripada IHC. Namun, pro dan kontra melekat pada kedua strategi tersebut. Faktanya, sekitar 5% hingga 11% kasus MSI tidak akan menunjukkan kehilangan protein MMR, karena mutasi missense pada gen MMR dapat menyebabkan inaktivasi fungsional protein tanpa mempengaruhi stabilitas dan antigenisitasnya dan, oleh karena itu, tingkat ekspresinya. Beberapa analisis, mengevaluasi biaya yang dihabiskan per tahun kehidupan yang diperoleh pada populasi umum, telah menyukai pengujian MSI berbasis PCR sebagai ukuran awal (Mvundura et al., 2010) sedangkan studi efektivitas biaya yang lebih baru lebih

menyukai skrining pasien dengan IHC (Ladabaum et al. ., 2011; Snowsill et al., 2015). Analisis yang lebih tua ini tidak mempertimbangkan efektivitas biaya dalam konteks pilihan imunoterapi yang efektif untuk pasien ini.³⁶

Association of Molecular Pathology mendukung gagasan bahwa metode skrining IHC dan MSI memberikan informasi pelengkap mengenai MMR yang rusak, dan dengan demikian merekomendasikan semua kasus CRC baru untuk dilakukan analisis MSI bersamaan, IHC untuk protein MMR, dan skrining mutasi BRAF (seperti yang dibahas dalam paragraf berikutnya), meskipun apakah ini adalah pendekatan yang paling hemat biaya pada populasi umum, masih bisa diperdebatkan (Mills et al., 2014). Snowsill et al., dengan jelas menunjukkan bahwa semua strategi yang disertakan untuk identifikasi LS (pengujian MSI, IHC, mutasi BRAF) hemat biaya dibandingkan tanpa pengujian.³⁶

2.9 Pemeriksaan Indirek MSI Melalui Imunohistokimia MMR

Deteksi delesi gen pada MMR secara tidak langsung dapat mencerminkan status MSI. Imunohistokimia (IHC) adalah suatu metode yang diadopsi untuk mendeteksi ekspresi protein MMR yang terdiri dari hMLH1, hPMS2, hMSH2 dan hMSH6. Jika hasil menunjukkan bahwa salah satu ekspresi protein MMR di atas tidak terekspresi, hal tersebut diinterpretasikan sebagai defisien MMR (dMMR). Jika keempat protein MMR diekspresikan hal tersebut diinterpretasikan sebagai Proficient Mismatch Repair (pMMR). Secara umum, dMMR mencerminkan MSI-H. IHC sangat sederhana dan praktis sehingga beberapa orang menganggapnya dapat digunakan untuk menggantikan PCR. Namun dalam beberapa kasus, dMMR dan MSI-H tidak dapat dideteksi secara bersamaan. Misalnya, dMMR yang disebabkan oleh mutasi MSH6 tidak dapat memenuhi kriteria diagnosis MSI-H, dan tumor positif MSI-H mungkin berasal dari protein jalur MMR yang tidak dapat dideteksi oleh teknologi saat ini. Oleh karena itu, beberapa penelitian menyarankan bahwa penerapan analisis molekuler pada analisis IHC dan MSI dapat mengurangi ketidaksesuaian hasil. (Li et al., 2020)



Gambar 6. Deteksi MSI atau defisiensi MMR dilakukan dengan (A1) imunohistokimia atau (A2) amplifikasi PCR. (B) Status MSI/MMR dapat diprediksi dari slide yang diwarnai hematoxylin dan eosin (H&E).

2.10 MUTL HOMOLOG 1 (MLH1)

Protein MutL homolog 1 (MLH1) adalah protein yang pada manusia dikodekan oleh gen MLH1 yang terletak pada kromosom 3. Gen ini umumnya dikaitkan dengan kanker kolorektal nonpoliposis herediter. Varian pada gen ini dapat menyebabkan kanker usus besar nonpoliposis herediter (sindrom Lynch). Ini adalah homolog manusia dari gen perbaikan ketidakcocokan DNA *E. coli*, *mutL*, yang memediasi interaksi protein-protein selama pengenalan ketidakcocokan, diskriminasi untai, dan penghilangan untai. Cacat pada MLH1 berhubungan dengan ketidakstabilan mikrosatelit yang diamati pada kanker usus besar nonpoliposis herediter. Protein MLH1 adalah salah satu komponen dari sisteempat protein perbaikan ketidakcocokan (MMR) DNA yang bekerja secara terkoordinasi dalam langkah-langkah berurutan untuk memulai perbaikan ketidakcocokan DNA pada manusia. Empat protein perbaikan ketidakcocokan DNA pada manusia adalah MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. Ketidakcocokan DNA terjadi ketika satu basa tidak

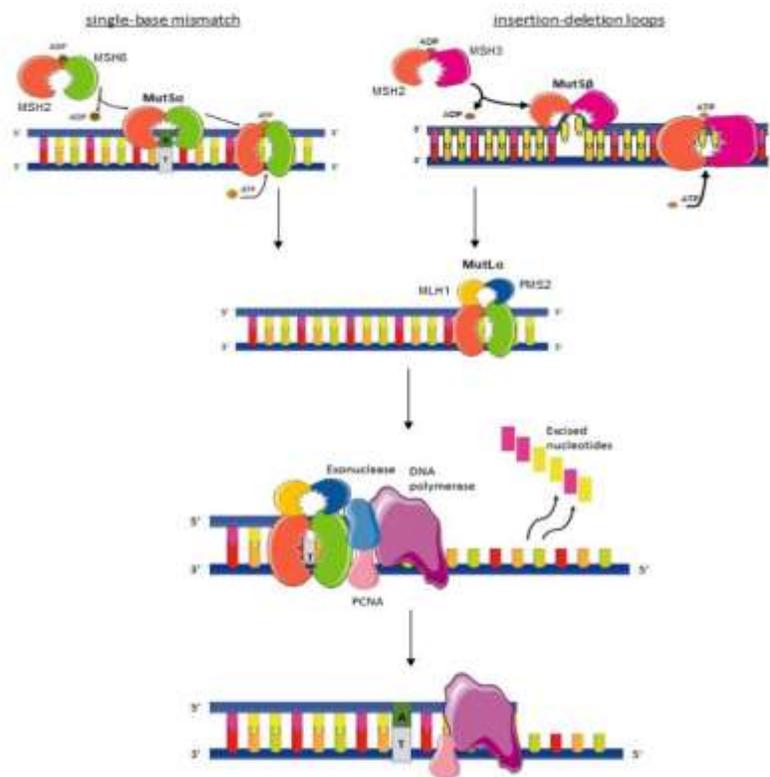
berpasangan dengan basa lain, atau ketika ada penambahan atau penghapusan singkat pada satu untai DNA yang tidak cocok dengan untai lainnya. Ketidakcocokan biasanya terjadi akibat kesalahan replikasi DNA atau selama rekombinasi genetik. Mengenali ketidaksesuaian tersebut dan memperbaikinya penting bagi sel karena kegagalan dalam melakukan hal tersebut mengakibatkan ketidakstabilan mikrosatelit (MSI). Heterodimer antara MSH2 dan MSH6 pertama-tama mengenali ketidakcocokan tersebut, meskipun heterodimer antara MSH2 dan MSH3 juga dapat memulai proses tersebut. Pembentukan heterodimer MSH2-MSH6 menampung heterodimer kedua MLH1 dan PMS2, meskipun heterodimer antara MLH1 dan PMS3 atau MLH3 dapat menggantikan PMS2. Kompleks protein yang terbentuk antara 2 set heterodimer memungkinkan inisiasi perbaikan cacat ketidakcocokan (Jaballah-Gabteni et al., 2019; Bhattarai et al., 2020).

2.11 PERAN MLH1 PADA KANKER KOLOREKTAL

Kanker kolorektal dapat berkembang melalui dua mekanisme utama, yaitu ketidakstabilan kromosom (CIN) dan ketidakstabilan mikrosatelit (MSI). Sebagian besar kasus CRC, sekitar 85%, diakibatkan oleh CIN, sedangkan sisanya, sekitar 15%, melibatkan MSI sebagai faktor utama. Mikrosatelit merupakan rangkaian pendek DNA yang berulang dan cenderung mudah mengalami mutasi. MSI terjadi ketika ada perubahan dalam jumlah nukleotida pada wilayah mikrosatelit, dan kondisi ini harus diidentifikasi serta diperbaiki oleh protein-protein dalam kompleks perbaikan mismatch repair (MMR), khususnya heterodimer seperti MSH2 yang berpasangan dengan MSH6 (MutS α). Kompleks ini memiliki fungsi krusial dalam mendeteksi dan memperbaiki kerusakan pada untai DNA, serta mendukung proses sintesis untai DNA yang baru bersama kompleks MutL α . Inaktivasi dalam salah satu dari protein MMR bisa menyebabkan MSI (Howe and Guillem, 1997; Dong et al., 2021).

MSI memainkan peran penting dalam pengelolaan klinis pasien. Contohnya, pasien dengan kanker kolorektal yang juga memiliki MSI cenderung memiliki prognosis yang lebih baik jika tidak menjalani kemoterapi dengan 5-FU pasca

operasi. Oleh karena itu, deteksi MSI sangat berguna dalam perencanaan terapi untuk menghindari potensi toksisitas dari beberapa pengobatan pada pasien dengan kanker kolorektal dan MSI. Metode standar untuk mendeteksi MSI adalah dengan polymerase chain reaction (PCR) yang menggunakan penanda seperti BAT25, BAT26, NR21, NR24, dan NR27, namun metode ini cukup mahal, terutama untuk penggunaan rutin di negara berkembang. Sebagai alternatif, penggunaan imunohistokimia (IHC) untuk deteksi protein MMR (MMRp) bisa diaplikasikan untuk menemukan MSI, dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang berkisar antara 77%-100% dan 98%-100% (Arshita et al., 2018).



Gambar 7 Mekanisme Mismatch Repair. MutS α (dimer MSH2-MSH6) mengenali ketidakcocokan pasangan basa tunggal dan kemudian mengelilingi DNA seperti penjepit dan kompleks MutL α (dimer MLH1-PMS2) diperbaiki. Kompleks MutS β (dimer MSH2-MSH3) mengenali loop penyisipan-penghapusan, kemudian kompleks MutL α difiksasi (Randrian, Evrard and Tougeron, 2021)

Perkembangan MLH1 adalah salah satu gen penting dalam sistem reparasi DNA *mismatch* (MMR) yang berperan dalam menjaga stabilitas genom. Mutasi pada gen MLH1 dapat menyebabkan disfungsi dalam mekanisme perbaikan DNA, yang pada gilirannya meningkatkan risiko terjadinya mutasi somatik pada sel lain yang dapat mengarah pada kanker, termasuk kanker kolorektal. Kanker kolorektal yang terkait dengan mutasi MSH2 sering dikategorikan dalam sindrom Lynch, juga dikenal sebagai kanker kolorektal herediter non-poliposis (HNPCC) (Silinskaite *et al.*, 2023).

Di Indonesia, riset mengenai kanker kolorektal dengan MSI masih tergolong jarang. Studi-studi yang telah ada menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam ekspresi protein MLH1 dan MSH2 antara pasien kanker kolorektal yang lebih tua dan yang lebih muda. Penelitian lain mengindikasikan bahwa ekspresi MSH6 lebih sering terjadi pada kolon bagian distal dibandingkan kolon proksimal, dengan perbedaan yang mencapai 11 kali lipat (Arshita *et al.*, 2018).

Mutasi di MLH1 mengurangi kemampuan sel untuk memperbaiki kesalahan replikasi DNA, sehingga meningkatkan frekuensi mutasi dalam gen-gen yang penting untuk regulasi sel, seperti APC, KRAS, dan p53. Ini adalah langkah awal dalam pembentukan adenoma (polip), yang bisa berkembang menjadi kanker kolorektal. Apabila terjadi kegagalan sistem MMR, sel-sel abnormal terus mengumpulkan mutasi yang menyebabkan perubahan lebih lanjut dalam perilaku sel, seperti invasi dan metastasis. Individu dengan mutasi bawaan di gen MLH1 memiliki risiko yang sangat tinggi untuk mengembangkan kanker kolorektal. Sindrom Lynch, yang diwariskan dalam pola autosomal dominan, merupakan penyebab utama kanker kolorektal herediter dan penyebab signifikan dari total kasus kanker kolorektal (Sehgal *et al.*, 2014; Jaballah-Gabteni *et al.*, 2019).

Sindrom Lynch yang juga dikenal sebagai kanker kolorektal herediter non-poliposis (HNPCC) diketahui memiliki dua sub-tipe yang dikenal sebagai Lynch Syndrome I (LS I) dan Lynch Syndrome II (LS II). LS I lebih banyak berhubungan dengan peningkatan risiko kanker kolorektal yang muncul lebih awal dalam kehidupan, sedangkan LS II juga dikaitkan dengan kemungkinan terjadinya kanker di

luar kolon, seperti kanker endometrium, selain kanker kolorektal itu sendiri. Sebagian besar kasus Sindrom Lynch, yang mencakup hingga 95% dari kasus yang telah teridentifikasi, disebabkan oleh mutasi genetik pada MLH1, MSH2, dan MSH6. Statistik menunjukkan variasi dalam risiko kumulatif mengembangkan kanker di mana saja pada usia 70, dengan pembawa mutasi MLH1 berisiko sekitar 71%, pembawa mutasi MSH2 antara 74,5% dan 77%, dan pembawa mutasi MSH6 berisiko antara 46,3% dan 75%. Risiko mengembangkan kanker sebelum usia 70 cenderung lebih tinggi pada mereka yang memiliki mutasi MLH1 dan MSH2 dibandingkan dengan mereka yang memiliki mutasi MSH6 (Sehgal et al., 2014; Jaballah-Gabteni et al., 2019).