

BAB I

PENDAHULUAN

I. LATAR BELAKANG

Kanker Kolorektal (KKR) merupakan keganasan yang berasal dari jaringan usus besar, yang dapat terdiri dari Kolon atau Kolon maupun keduanya. Kanker kolorektal menjadi penyebab utama ketiga kematian terkait kanker pada pria dan wanita dan penyebab tertinggi kedua dari kematian akibat kanker bila angka kejadian pada pria dan wanita digabungkan. Kanker kolorektal umumnya mengenai orang dewasa dengan usia ≥ 50 tahun. Di Indonesia, angka kejadian kanker kolorektal tercatat sebanyak 396.914 kasus baru dengan kematian sebanyak 234.511 kasus dan menempati urutan terbanyak ketiga dari seluruh jenis kasus kanker di Indonesia.

Data Globocan 2012, insiden karsinoma kolorektal di Indonesia adalah 12,8 per 100.000 penduduk usia dewasa, dengan mortalitas 9,5% dari seluruh kasus karsinoma. Di Indonesia karsinoma kolorektal sekarang menempati urutan nomor 3, kenaikan tajam yang diakibatkan oleh perubahan pada diet orang Indonesia, baik sebagai konsekuensi peningkatan kemakmuran serta pergeseran kearah cara makan orang barat (westernisasi) yang lebih tinggi lemak serta rendah serat[3].

Di Makassar, setiap tahun terjadi peningkatan kasus KKR. 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 FK UNHAS Makassar pada tahun 2005 KKR menempati urutan keempat dari seluruh keganasan, tahun 2006 tercatat 107 kasus KKR dan menempati urutan ketiga, tahun 2008 ditemukan 272 kasus KKR dan menempati urutan kedua setelah kanker payudara[4].

Kebanyakan KKR dimulai dengan polip yang terjadi pada lapisan epitel usus besar atau Kolon. Polip ini mungkin jinak (misalnya, polip hiperplastik), pra-ganas (misalnya, adenoma tubular) atau ganas (misalnya, adenokarsinoma kolorektal). Diperkirakan sekitar 20% kasus KKR memiliki riwayat keluarga KKR. Beberapa sindrom genetik terkait dengan risiko KKR yang lebih besar, misalnya, kanker kolorektal nonpolyposis herediter (sindrom HNPCC atau Lynch) menyumbang sekitar

3% orang dengan KKR, dan sindrom Gardner dan poliposis adenomatosa familial (FAP) hampir selalu dikaitkan dengan KKR dan merupakan penyebab sekitar 1% dari semua kasus KKR. Namun, mayoritas kasus KKR lebih terkait dengan faktor lingkungan daripada perubahan genetik yang diturunkan[1].

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[1].

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 (RAS), Tumor Suppressor gen (APC, DCC, P53) dan Mismatch repair gen(hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2).

Anggota famili RAS sering ditemukan dalam bentuk onkogenik yang bermutasi pada tumor manusia. Protein ras mutan secara konstitutif aktif, karena berkurangnya aktivitas intrinsik GTPase dan ketidakpekaan terhadap protein pengaktif GTPase (GAPs). Secara total, mengaktifkan mutasi di gen RAS terjadi pada sekitar 20% dari semua kanker manusia, terutama pada kodon 12, 13 atau 61. Mutasi pada NRAS menyebabkan sekitar 85% dari semua mutasi RAS pada tumor manusia, sekitar 15% NRAS , dan kurang dari 1% HRAS. Khususnya gen RAS yang bermutasi tampaknya menjadi tumor yang spesifik; kanker Kolon, pankreas dan paru-paru memiliki frekuensi mutasi NRAS yang tinggi. Sebagai contoh, kami menyatakan bahwa mutasi gen NRAS ada pada 277 (36%) dari 772 kanker kolorektal yang dianalisis. Mutasi NRAS 36, sebaliknya, sering terjadi pada leukemia myeloid dan melanoma kulit. Namun demikian, frekuensi mutasi NRAS pada kanker kolorektal masih belum jelas.

Diberbagai negara penelitian tentang NRAS terus dilakukan, tetapi khususnya Indonesia dari beberapa rumah sakit pusat pendidikan penelitian tentang gen NRAS masih langka, namun dengan kemajuan pengetahuan biologi molekuler saat ini, sudah dapat dilakukan dengan tersedianya sarana pemeriksaan untuk penelitian ini yaitu polymerasechain reaction (PCR).

Telah banyak penelitian yang telah menghubungkan antara golongan darah ABO terhadap keganasan pada saluran cerna. Golongan darah ABO diturunkan dari gabungan golongan darah kedua orang tua yang diturunkan berdasarkan Hukum Mendel. Golongan darah adalah pengklasifikasian darah dari suatu individu berdasarkan ada atau tidak adanya zat antigen warisan pada permukaan membran sel darah merah. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan jenis karbohidrat dan protein pada permukaan membran sel darah merah tersebut. (Dennis 2013, Reid ME 1990, Steven H 1986, Yuksel U 2012, Yuan M 1985).

Antigen golongan darah ABO tidak hanya ditemukan pada sel darah merah tetapi juga ditemukan di epitel sel jaringan tubuh yang lain termasuk Kolon. Antigen golongan darah dapat ditemukan di seluruh bagian fetus dan tidak ditemukan pada bagian distal Kolon orang dewasa. Pada penelitian ditemukan ekspresi antigen golongan darah ABO pada polip Kolon distal dan KKR Distal. Antigen golongan darah ABO pembentukannya diatur oleh gen A, gen B (Kromosom 9), dan gen H (Kromosom 19). Perubahan struktur kromosom 9 telah ditemukan pada berbagai jenis kanker.

Beragam hasil penelitian mengenai ekspresi antigen ABO pada kejadian kanker saluran pencernaan masih merupakan kontroversi di berbagai belahan dunia, khususnya di Indonesia sehingga dapat dijadikan acuan ke depan.

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan masukan bagi penanganan karsinoma kolorektal khususnya dalam upaya menurunkan angka insidens dan mortalitas penyakit tersebut. Disamping itu hal ini dapat dipakai untuk skrining dan pencegahan dini yang lebih mudah, murah dan dapat dilakukan secara efektif dan efisien.

II. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah maka dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut: Apakah ada hubungan Mutasi NRAS Exon 2 dengan Aspek Klinikopatologis pada Penderita Kanker Rektum.

III. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan Umum

Mengetahui hubungan antara Mutasi NRAS Exon 2 dengan Aspek Klinikopatologis pada Penderita Kanker Rektum.

Tujuan Khusus

- a. Mengetahui hubungan antara mutasi NRAS Exon 2 dengan Jenis Kelamin pada Penderita kanker rektum.
- b. Mengetahui hubungan antara mutasi NRAS Exon 2 dengan Umur pada Penderita kanker rektum.
- c. Mengetahui hubungan antara mutasi NRAS Exon 2 dengan Stadium Kanker Rektum pada Penderita kanker rektum.
- d. Mengetahui hubungan antara mutasi NRAS Exon 2 dengan Grading Kanker Rektum pada Penderita kanker rektum.
- e. Mengetahui hubungan antara mutasi NRAS Exon 2 dengan Golongan Darah A, B, dan AB pada Penderita kanker rektum.

IV. MANFAAT PENELITIAN

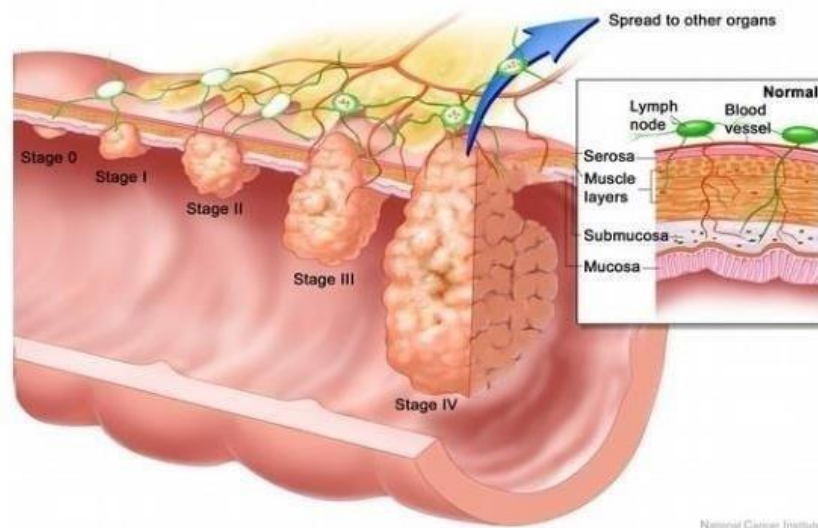
1. Pendidikan : memberikan informasi mengenai Mutasi KRAS Exon 2 dengan aspek klinikopatologis pada Penderita Kanker Rektum.
2. Penelitian : memberikan informasi berupa data biologi molekuler tentang mutasi KRAS Exon 2 dengan aspek klinikopatologis dalam hubungannya dengan kanker rektum yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya mengenai kanker kolorektal.
3. Pelayanan:
 - a. Meningkatkan kewaspadaan dan pemantauan pada penderita KKR dengan ditemukannya mutasi KRAS Exon 2 pada aspek klinikopatologis tertentu.
 - b. Sebagai data dasar pertimbangan dalam upaya pengelolaan kanker kolorektal sehingga pengelolaan kanker kolorektal di masa yang akan datang akan lebih baik dan tepat guna.
 - c. Sebagai data dasar untuk penelitian lebih lanjut pada karsinoma 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

II.1 Definisi

Karsinoma kolorektal (KKR) atau disebut juga karsinoma usus besar adalah keganasan 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). Gejala adanya tumor pada Kolon biasanya ditandai dengan adanya polip yang memiliki resiko karsinoma. Sekitar 96% penyebab karsinoma kolorektal adalah adenokarsinoma yang berkembang dari jaringan kelenjar[1,3].



Gambar 2. Penyebaran Kanker Kolorektal[1]

(Sumber: Hazma, 2017)

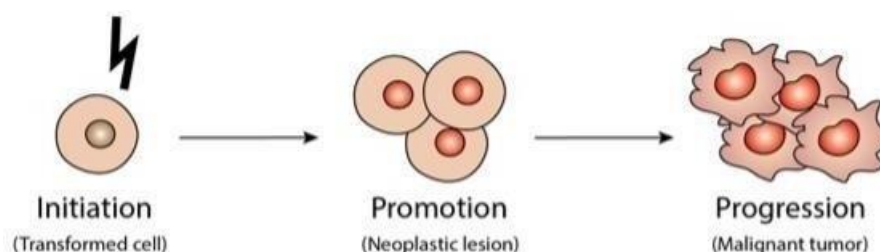
Pada gambar di atas terlihat penyebaran karsinoma di Kolon atau Rektum. Pada saat stage 0 atau normal tidak ditemukan adanya karsinoma yang tumbuh pada Kolon atau Rektum. Karsinoma tumbuh di usus besar melalui lapisan dan menembus lapisan dinding usus besar atau Kolon. Karsinoma yang telah menembus dinding juga dapat menembus darah atau kelenjar getah bening (lymph node), yang merupakan saluran tipis. Pada umumnya, sel-sel karsinoma pertama kali menyebar ke kelenjar getah bening di dekat sel karsinoma tersebut, kelenjar getah bening memiliki struktur seperti kacang yang membantu melawan infeksi. Sel-sel karsinoma itu dapat dibawa

oleh pembuluh darah (blood vessel) kehati, paru-paru, rongga perut, atau ovarium. Proses dimana sel-sel karsinoma menyebar ke organ lain melalui pembuluh darah disebut metastasis[9].

Karsinogenesis

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 disandikan, 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[5].

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 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[5,6].



Gambar 1. Karsinogenesis (7)

Sumber: Ferreira, 2017

II.1.1 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[8].

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[7].

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[7].

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 [7].

Kokarsinogenesis

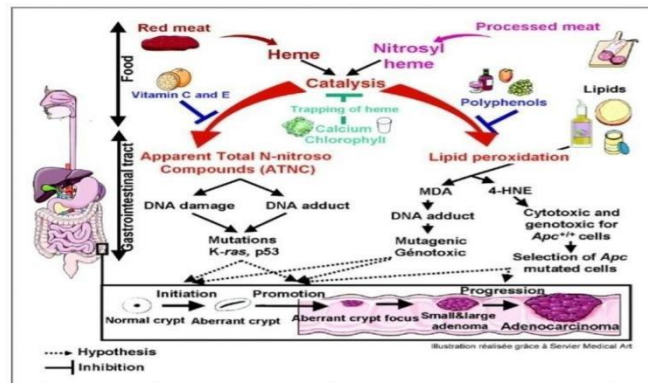
Kokarsinogenesis adalah proses di mana dua atau lebih senyawa, bila diberikan secara bersamaan, meningkatkan risiko perkembangan tumor. Dalam beberapa kasus, cocarcinogen tidak karsinogenik dengan sendirinya, tetapi meningkatkan potensi karsinogenik dari suatu pemicu. Dalam kasus lain, kedua senyawa 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[6].

II.2 Peran Faktor Risiko KKR dalam Patogenitasnya

Kombinasi faktor predisposisi genetik dan lingkungan biasanya menyebabkan kanker usus besar. Risiko kesehatan berkontribusi pada sekitar 20% kasus. Poliposis adenomatosa familial merupakan sindrom predisposisi turunan utama, kanker kolorektal nonpolyposis herediter, dan jenis tumor lain dengan riwayat keluarga. Faktor lingkungan menyumbang 80% kasus. Faktor tersebut termasuk diet rendah serat, sayuran, dan folat dan tinggi lemak, daging merah; konsumsi alkohol dalam jumlah banyak; pekerjaan menetap (tidak bergerak); dan merokok[1].

Meskipun kanker kolorektal dapat muncul pada waktu yang berbeda dan untuk alasan yang berbeda, mereka berbagi jalur acak yang umum dari epitel normal melalui polip ke karsinoma. Dalam proses ini sejumlah perubahan genetik diamati, termasuk inaktivasi gen penekan tumor dan aktivasi onkogen spesifik. Beberapa penelitian telah menunjukkan mutasi p53, adenomatous polyposis coli (APC), NRAS

dan / atau perubahan protein seperti APC dan ketidakstabilan mikrosatelit DNA atau hilangnya heterozigositas. Mutasi muncul sebagai cacat germline yang diturunkan atau muncul dalam sel somatik akibat kerusakan lingkungan, yang terus berkontribusi pada perkembangan tumor usus besar[1].



Gambar 3. Mekanisme daging merah menyebabkan KKR[1]

(Sumber: Hazma, 2017)

II.2.1 Faktor Risiko yang Tidak Dapat Dimodifikasi

Beberapa faktor risiko dikaitkan dengan kejadian KKR. Faktor-faktor yang tidak dapat dikendalikan oleh seseorang termasuk usia dan faktor keturunan. Selain itu, sejumlah besar faktor risiko lingkungan dan gaya hidup mungkin memainkan peran penting dalam pengembangan KKR, seperti yang tertera dibawah ini.

Usia

Kemungkinan diagnosis KKR meningkat setelah usia 40 tahun, meningkat secara progresif dari usia 40 tahun, meningkat tajam setelah usia 50 tahun. Lebih dari 90% kasus kanker kolorektal terjadi pada orang berusia 50 atau lebih. Angka kejadian lebih dari 50 kali lebih tinggi pada orang yang berusia 60 sampai 79 tahun dibandingkan mereka yang lebih muda dari 40 tahun. Namun, KKR tampaknya meningkat di antara orang-orang yang lebih muda. Faktanya, di Amerika Serikat, KKR adalah salah satu dari 10 kanker yang paling sering didiagnosis di antara pria dan wanita berusia 20 hingga 49 tahun[1,10].

Riwayat pribadi polip adenomatosa

Polip neoplastik kolorektal, yaitu adenoma tubular dan vili, merupakan lesi prekursor KKR. Risiko seumur hidup untuk mengembangkan adenoma kolorektal hampir 19% pada populasi AS. Hampir 95% kanker kolorektal sporadis berkembang dari adenoma ini. Individu dengan riwayat adenoma memiliki peningkatan risiko

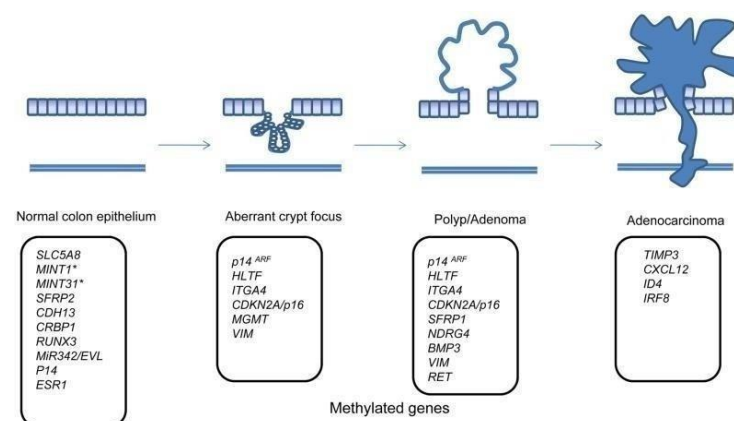
terkena kanker kolorektal, dibandingkan individu yang tidak memiliki riwayat adenoma. Periode laten yang lama, diperkirakan 5 sampai 10 tahun, biasanya diperlukan untuk perkembangan keganasan dari adenoma. Deteksi dan pengangkatan adenoma sebelum transformasi maligna dapat mengurangi risiko KKR[1,10].

Riwayat pribadi IBD

Kolitis ulserativa dan penyakit Crohn biasanya digambarkan sebagai penyakit radang usus (IBD). Kolitis ulserativa menyebabkan peradangan pada mukosa Kolon dan rektum. Penyakit Crohn menyebabkan radang yang penuh kesehatan dinding usus dan mungkin melibatkan bagian manapun dari saluran pencernaan dari mulut ke anus. Kondisi ini meningkatkan risiko keseluruhan individu terkena kanker kolorektal. Risiko relatif KKR pada pasien dengan penyakit radang usus telah diperkirakan antara 4 sampai 20 kali lipat [1,10].

Riwayat Keluarga KKR atau Polip Adenomatosa

Mayoritas kasus KKR terjadi pada orang tanpa riwayat keluarga KKR atau penyakit yang mempengaruhi. Hingga 20% orang yang mengembangkan KKR memiliki anggota keluarga lain yang pernah terkena penyakit ini. Orang dengan riwayat KKR atau polip adenomatosa pada satu atau lebih kerabat tingkat pertama berada pada peningkatan risiko. Alasan untuk peningkatan risiko tidak jelas, tetapi kemungkinan karena gen yang diturunkan, faktor lingkungan bersama, atau beberapa kombinasi dari semuanya[1,10].



Gambar 4. Patofisiologi polip edema menjadi KKR[11]

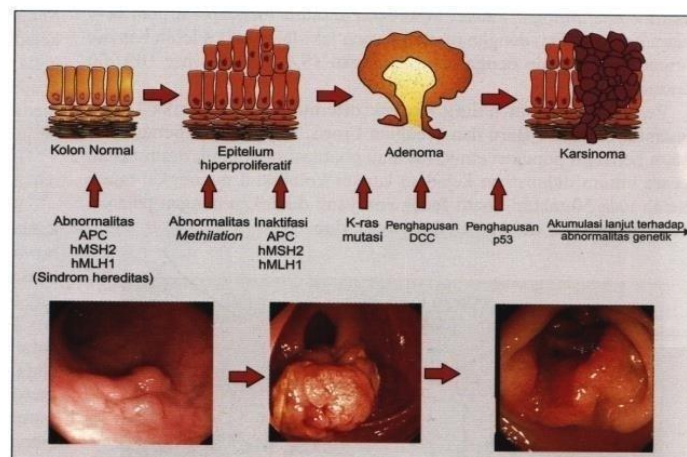
Riwayat Genetik yang diwarisi

Sekitar 5 hingga 10% kanker kolorektal adalah konsekuensi dari kondisi keturunan yang diketahui. Kondisi bawaan yang paling umum adalah FAP dan HNPCC, juga disebut sindrom Lynch. Gen yang bertanggung jawab atas bentuk-bentuk KKR yang diwariskan ini telah diidentifikasi. HNPCC dikaitkan dengan

mutasi pada gen yang terlibat dalam jalur perbaikan DNA, yaitu gen MutL homolog 1 (MLH1) dan MutS protein homolog 2 (MSH2), yaitu mutasi yang bertanggung jawab pada individu dengan HNPCC. FAP disebabkan oleh mutasi pada gen penekan tumor APC. Risiko seumur hidup KKR pada orang dengan mutasi terkait HNPCC yang diakui mungkin setinggi 70 sampai 80%, dan usia rata-rata saat didiagnosis pada pertengahan 40-an. Mutasi MLH1 dan MSH2 juga terkait dengan peningkatan risiko relatif beberapa jenis kanker lainnya, termasuk beberapa keganasan ekstra Kolonik, yaitu kanker rahim, lambung, usus halus, pankreas, ginjal, dan uretra. FAP menyumbang kurang dari 1% dari semua kasus KKR[1,10].

II.2.2 Faktor Risiko Lingkungan

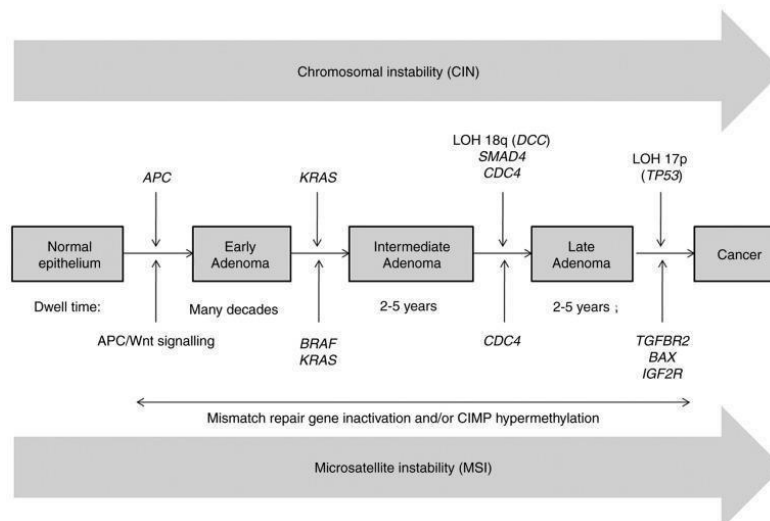
Kanker kolorektal secara luas dianggap sebagai penyakit lingkungan termasuk faktor budaya, sosial, dan gaya hidup. Dengan demikian, KKR adalah salah satu kanker utama yang penyebabnya dapat dimodifikasi dapat segera diidentifikasi, dan sebagian besar kasus secara teoritis dapat dicegah. Bukti risiko lingkungan berasal dari studi tentang hibah dan keturunannya. Misalnya, di antara keturunan migran Eropa selatan ke Australia dan migran Jepang ke Hawaii, risiko KKR meningkat dibandingkan dengan populasi di negara asal[1,10].



Gambar 5. Perjalanan Karsinoma Kolorektal

II.3 Jalur Molekuler Kanker Kolorektal

Ketidakstabilan genom merupakan ciri penting yang mendasari kanker kolorektal. Mekanisme patogen yang mengarah pada situasi ini dapat diklasifikasikan dalam tiga jalur berbeda, yaitu ketidakstabilan kromosom (CIN), ketidakstabilan mikrosatelit (MSI) dan fenotipe metilator pulau CpG (CIMP)[10].



Gambar 6. Jalur molekular KKR[12]

II.3.1 Jalur CIN

Jalur CIN, yang juga dianggap sebagai jalur klasik karena mewakili penyebab hingga 80% -85% dari semua kasus KKR, ditandai dengan ketidakseimbangan dalam jumlah kromosom, sehingga menyebabkan tumor aneuploid dan tumor hilangnyaheterozigositas (LOH). Mekanisme yang mendasari CIN termasuk perubahan dalam segregasi kromosom, disfungsi telomer dan respon kerusakan DNA, yang mempengaruhi gen kritis yang terlibat dalam pemeliharaan fungsi sel yang benar, seperti APC , NRAS , PI3K dan TP53 . APC mutasi menyebabkan translokasi β -catenin ke nukleus dan mendorong transkripsi gen yang terlibat dalam tumor dan invasi, sedangkan mutasi pada NRAS dan PI3K menyebabkan aktivasi MAP kinase yang konstan, sehingga meningkatkan proliferasi sel. Akhirnya, mutasi loss-of-function di TP53 , yang mengkodekan untuk p53, pos pemeriksaan siklus-sel utama, menyebabkan entri yang tidak terkontrol dalam siklus sel [12,13].

II.3.2 Jalur MSI

Jalur ketidakstabilan Mikrosatelit disebabkan oleh fenotipe yang hipermutatif karena hilangnya mekanisme perbaikan DNA. Kemampuan untuk memperbaiki rantai DNA pendek atau pengulangan tandem (dua sampai lima pengulangan pasangan basa) menurun pada tumor dengan ketidakstabilan mikrosatelit; Oleh karena itu, mutasi cenderung terakumulasi di wilayah tersebut. Mutasi ini dapat mempengaruhi daerah non-pengkodean serta pengkodean mikrosatelit, dan tumor berkembang ketika kerangka pembacaan onkogen atau gen penekan tumor yang dikodifikasi dalam mikrosatelit diubah. Hilangnya ekspresi mismatch repair genes (MMR) dapat

disebabkan oleh kejadian spontan (hipermetilasi promotor) atau mutasi germinal seperti yang ditemukan pada sindrom Lynch. Tumor ini terutama diploid dan memiliki lebih sedikit LOH. Gen yang bermutasi pada tumor dengan ketidakstabilan mikrosatelit termasuk MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 dan PMS2. Secara umum, tumor MSI memiliki prognosis yang lebih baik daripada tumor sporadis[12,13].

II.3.3 Jalur CIMP

Ketidakstabilan epigenetik, yang bertanggung jawab atas fenotipe metilator pulau CpG, adalah ciri umum lain di KKR. Karakteristik utama tumor CIMP adalah hipermetilasi promotor onkogen, yang menyebabkan pembungkaman genetik dan hilangnya ekspresi protein. Genetika dan epigenetik tidak eksklusif dalam kanker kolorektal, dan keduanya bekerja sama dalam perkembangannya, dengan lebih banyak peristiwa metilasi daripada mutasi titik yang sering ditemukan. Salah satu contoh efek gabungan dari genetika dan epigenetik dalam proses perkembangan kanker kolorektal adalah adanya mutasi BRAF serta ketidakstabilan mikrosatelit di banyak tumor CIMP[12,13].

II.3.4 Kromosom 18q

Kehilangan alel pada kromosom 18q terdeteksi di ~ 70% dari KKR primer pada proses karsinogenik lanjut, dan dianggap sebagai penanda prognosis yang buruk untuk kelangsungan hidup pada pasien dengan KKR. Frekuensi tinggi penghapusan alel yang melibatkan kromosom 18q menunjukkan adanya kandidat gen penekan tumor yang inaktivasi dapat berperan penting dalam KKR, termasuk DCC, SMAD2 dan SMAD4. DCC, terletak di pita kromosom 18q21.2, yang mengkode komponen reseptor neutrin-1, diusulkan sebagai gen penekan tumor yang diduga. Namun, banyak data yang dilaporkan tentang hilangnya dan inaktivasi DCC bersifat tidak langsung dan gagal memberikan bukti konklusif bahwa DCC berfungsi sebagai gen penekan tumor. Lebih lanjut, sepanjang pengetahuan kami, tidak ada bukti bahwa mutasi germline dari DCC berperan dalam kanker yang diturunkan; dan beberapa mutasi somatik di DCC telah dilaporkan di KKR. Kehadiran dua gen penekan tumor mapan lainnya, SMAD2 dan SMAD4 di daerah kerugian juga menantang fungsi DCC sebagai gen penekan tumor[12,13].

Faktanya, gen SMAD2 dan SMAD4 terlokalisasi di 18q21.1, wilayah kehilangan umum 18q di KKR. Gen SMAD ini mengkodekan transduser sinyal hilir untuk mentransformasikan faktor pertumbuhan- β (TGF- β), dan perubahannya dapat

memberikan resistensi terhadap TGF- β dan berkontribusi pada tumorigenesis. SMAD4 diidentifikasi menjadi tidak aktif pada ~ 60% kanker pankreas. Namun frekuensi SMAD4 dan SMAD2 mutasi somatik relatif rendah di KKR. Namun demikian, daerah kehilangan yang lebih kecil, yang mengecualikan SMAD2 dan SMAD4, telah dilaporkan pada kanker skuamosa kepala dan leher. Selain itu, ekspresi gen mereka dipertahankan di KKR dengan LOH 18q. Secara keseluruhan, pengamatan ini menunjukkan bahwa SMAD2 dan SMAD4 tidak mungkin menjadi target kromosom 18q mayor untuk inaktivasi di KKR, dan bahwa gen penekan tumor lain selain gen DCC dan SMAD mungkin menjadi target hilangnya kromosom 18q[12].

II.3.5 APC/Beta-catein

Aktivasi jalur pensinyalan Wnt melalui mutasi APC, sebuah gen penekan tumor multi-fungsi pada 5q22.2, sangat penting dan kejadian paling awal dalam perkembangan KKR. Protein APC adalah komponen kunci dari kompleks penghancuran β -catenin yang terlibat dalam degradasi dan penekanan jalur pensinyalan Wnt / β -catenin. APC mutan mengganggu pembentukan kompleks penghancur yang mengarah ke stabilisasi dan akumulasi protein β -catenin di sitoplasma. Protein β -catenin yang terakumulasi ditranslokasi ke inti sel di mana ia membentuk kompleks dengan TCF / LEF, dan menginduksi aktivasi berlebihan dari efektor hilir Wnt yang, pada gilirannya, mempromosikan proliferasi, migrasi, invasi dan metastasis sel kanker. Hasil yang samajuga diamati dengan mutasi pada β -catenin dan AXIN2, tetapi pada tingkat yang lebih rendah. Khususnya, mutasi di AXIN2 telah dilaporkan di KKR hanya dengan MSI[12].

Mutasi APC atau kehilangan alel telah diidentifikasi pada ~ 90% pasien dengan KKR. Mutasi germline di APC bertanggung jawab atas FAP, sementara mutasi somatik dan / atau penghapusan alel APC dijelaskan dalam KKR sporadic. The APC gen juga dapat epigenetically tidak aktif melalui hypermethylation promotor yang telah diidentifikasi dalam 18% dari primer colorectal carcinoma dan adenoma kasus[12].

II.3.6 TP53

TP53 adalah gen penekan tumor yang terletak di lengan pendek kromosom 17, yang biasanya hilang pada karsinoma kolorektal. TP53 telah didefinisikan sebagai 'penjaga genom' karena ia mengkodekan faktor transkripsi yang mengatur transkripsi ratusan gen yang terlibat dalam proses yang berbeda, termasuk perbaikan DNA, penangkapan siklus sel, penuaan, apoptosis, dan metabolisme sebagai respons terhadap berbagai proses. sinyal stres. Pada kerusakan DNA, misalnya, TP53 menginduksi penangkapan siklus sel pada fase G 1 atau G 2 , atau memicu apoptosis ketika kerusakan terlalu parah dan tidak dapat diperbaiki. Kehilangan TP53 fungsi, oleh karena itu, berkontribusi pada penyebaran DNA yang rusak ke sel anak[12].

Perubahan TP53 adalah ciri khas tumor manusia, dan status mutasi TP53 dikaitkan dengan perkembangan dan hasil KKR sporadis. Khususnya, hilangnya fungsi TP53 telah dilaporkan pada 50-75% kasus KKR, jauh lebih tinggi dibandingkan dengan adenoma, yang menunjukkan perannya dalam transisi dari adenoma ke karsinoma. Sampai saat ini, mayoritas mutasi TP53 yang dilaporkan di KKR adalah mutasi missense yang menggantikan GC dengan AT. Liu dan Bodmer telah menganalisis mutasi TP53 dan ekspresinya dalam 56 baris sel KKR, dan melaporkan frekuensi yang relatif tinggi dari TP53 mutasi (76,8%), di mana mutasi missense menyumbang 47,83% dan mutasi titik yang merupakan transisi di situs CpG menyumbang 37,5%. Mutasi ini membuat protein tidak aktif dengan waktu paruh panjang yang tidak normal yang dapat dideteksi dengan imunohistokimia[12].

II.3.7 NRAS

NRAS merupakan mutasi onkogen kanker pada manusia. Kebanyakan (97%) dari mutasi melibatkan kodon 12, 13, dan 61. NRAS mutasi sangat berguna dalam terapi pada pasien kanker termasuk kanker Kolon dan melanoma. NRAS adalah protein pengikat GTP / GDP yang terikat membran dengan aktivitas GTPase intrinsik dan diekspresikan disebagian besar sel manusia. Peralihan antara keadaan aktif terikat GTP dan keadaan terikat PDB tidak aktif diatur oleh protein pengaktif GTPase dan faktor pertukaran nukleotida guanin. Mutasi NRAS mengganggu aktivitas GTPase intrinsik NRAS , menyebabkan akumulasi dari NRAS protein pada keadaan aktif terikat GTP, akhirnya menghasilkan aktivasi konstitutif dari jalur pensinyalan proliferasi hilir[14].

Mutasi onkogenik dalam gen RAS telah diidentifikasi pada ~ 30% dari semua tumor manusia (73), di mana mutasi pada NRAS terhitung ~ 85%, NRAS proto-onkogen GTPase (NRAS) untuk ~ 15%, dan HRas proto-onkogen GTPase (HRAS) untuk <1%. Beberapa penelitian telah melaporkan hubungan antara mutasi NRAS , dan prognosis KKR yang buruk, dan paru dan metastasis hati. Sebaliknya, beberapa penelitian lain melaporkan bahwa NRAS mutasi adalah prediktor independen yang kuat bertahan hidup pada pasien dengan KKR. Temuan kontradiktif ini dapat dijelaskan oleh perbedaan dalam distribusi mutasi NRAS spesifik, stadium saat diagnosis atau karakteristik lainnya. NRAS mutasi telah muncul sebagai penanda prediktif penting dari resistensi reseptor anti-faktor pertumbuhan epidermal (EGFR) agen, termasuk panitumumab dan cetuximab[14].

Mengaktifkan mutasi NRAS telah diidentifikasi pada 35-45% kasus KKR, dan terutama terjadi pada kodon 12 dan 13. Perubahan yang paling sering diamati pada kodon ini adalah substitusi glisin untuk aspartat (p.G12D, p.G13D). Tingkat mutasi NRAS, sebaliknya lebih rendah (1-3%) dan mengaktifkan mutasi HRAS belum terdeteksi di KKR. Sebelumnya, pyrosequencing NRAS, BRAF dan subunit katalitik fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat 3-kinase α mengungkapkan bahwa 53,8% pasien menunjukkan mutasi NRAS pada kodon 12 atau 13, dimana 57,9% adalah c.38G> A(pG13D), dan 22,2% adalah c35G> Mutasi T (p.G12V) [14].

II.4 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[12].

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 NRAS somatik telah dianggap sebagai prediktor resistensi terhadap terapi anti-EGFR. Demikian status NRAS 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[12].

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[12].

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[12].

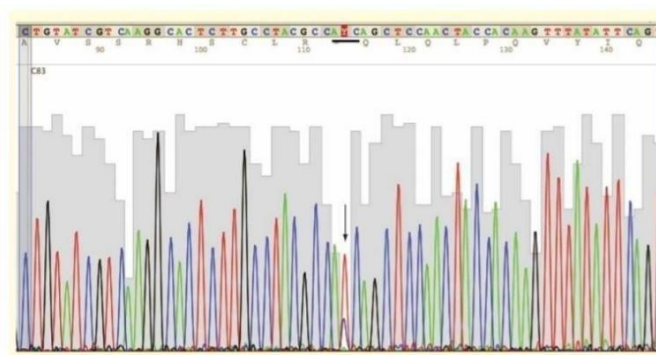
II.5 Pemeriksaan NRAS

Pemeriksaan molekuler mutasi NRAS saat ini digunakan baik untuk diagnosis dan untuk memprediksi respons terhadap terapi yang ditargetkan. Bahan awal untuk pengujian ini meliputi jaringan formalin fixed paraffin-embedded (FFPE), jaringan frozen section dan sediaan sitologi. Untuk meningkatkan sensitivitas tes, seringkali

ahli patologi terlatih memilih area yang diperkaya tumor dari bagian histologis untuk makro atau mikro sebelum ekstraksi DNA. Saat ini, pada dasarnya semua metode menggunakan PCR dengan primer spesifik untuk memperkuat hotspot mutasi gen NRAS (ekson 2 dan 3) dan kemudian menggunakan teknik hilir yang berbeda untuk membedakan urutan wildtype dari urutan mutan. Teknik umum termasuk metode seperti Sanger sequencing, pyrosequencing, analisis polimorfisme konformasi untai tunggal (SSCP), PCR real time dengan analisis kurva melting dan PCR spesifik alel, akan dibahas secara singkat di bawah ini[15].

II.5.1 Sanger sequencing

Sanger sequencing dari templat DNA yang diamplifikasi oleh PCR dianggap sebagai standar emas untuk pemeriksaan NRAS. Sanger sequencing menggunakan campuran deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) dan dideoxynucleoside triphosphates (ddNTPs) yang diberi label dengan fluoresen untuk menghasilkan fragmen bersarang dengan terminasi rantai selama sintesis DNA pelengkap. Fragmen yang diperkuat kemudian dipisahkan dengan elektroforesis gel resolusi tinggi dan urutannya dibaca saat fragmen melewati sistem deteksi laser. Sebuah studi menggunakan sekuensing Sanger otomatis untuk pengujian NRAS menemukan bahwa metode ini memiliki sensitivitas rendah untuk subset dari mutasi kodon 12 serta tingkat positif palsu 11,1% dan tingkat negatif palsu 6,1%, terutama saat menguji sampel jaringan FFPE[15].



Gambar 7. Ilustrasi Sanger Sequencing[15]

(Sumber: Perincheri, 2015)

II.5.2 Pyrosequencing

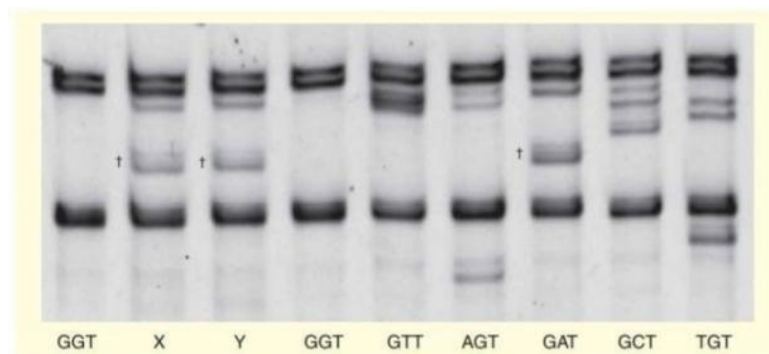
Dalam pyrosequencing, sintesis DNA polimerase dari DNA pelengkap dari DNA template imobilisasi dukungan padat dilakukan dengan penambahan jumlah terbatas dNTPs spesifik. Pirofosfat anorganik yang dilepaskan setelah penggabungan basa komplementer mengalami serangkaian reaksi enzimatik yang pada akhirnya menghasilkan sinyal cahaya yang dideteksi sebagai puncak dalam sebuah program. pyrosequencing telah berhasil digunakan dalam pengujian mutasi NRAS pada jaringan yang tertanam parafin dengan batas deteksi kurang dari 5% [15].

II.5.3 High-resolution melting analysis

High-resolution melting analysis adalah teknik di mana amplicon DNA didenaturasi dan diubah sifatnya pada kisaran suhu tertentu dengan adanya pewarna fluoresen yang mengikat dsDNA dan memancarkan fluoresensi terang. Intensitas fluoresensi menurun dengan denaturasi DNA pada suhu yang meningkat dan diplot pada kurva. Mutasi diidentifikasi oleh kurva melting yang berbeda dibandingkan dengan amplicon wild-type. Dengan sensitivitas yang dilaporkan 5-10% dan biaya rendah, High-resolution melting analysis sering direkomendasikan untuk throughput tinggi [15].

II.5.4 Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP)

Di SSCP, wilayah yang diinginkan diperkuat dan DNA-nya kemudian didenaturasi oleh panas dan dengan cepat direnaturasi di atas es dan kemudian pada gel SSCP. Renaturasi yang cepat menyebabkan lipatan DNA untai tunggal. Amplicon mutan mengadopsi struktur sekunder yang berbeda dari DNA tipe liar yang dicerminkan oleh mobilitas yang berbeda pada elektroforesis gel [15].



Gambar 8. SSCP analysis NRAS mutase kodon 12 [15]

(Sumber: Perincheri, 2015)

II.5.5 DNA gradient gel electrophoresis

Dalam elektroforesis gel gradien DNA, DNA untai ganda dielektroforesis di bawah kondisi denaturasi ringan. Amplikon mutan mengadopsi konformasi struktural yang berbeda dibandingkan dengan urutan tipe liar, yang tercermin dari mobilitas yang berbeda pada elektroforesis gel. Mirip dengan SSCP, elektroforesis gel gradien DNA adalah metode skrining yang baik untuk mutan NRAS, yang memerlukan konfirmasi dengan metode lain. Seperti dalam analisis SSCP, pengurutan selanjutnya diperlukan untuk mengidentifikasi basis yang bermutasi[15].

II.5.6 Allele-specific PCR dan metode terkait lainnya

PCR spesifik alel bergantung pada prinsip bahwa efisiensi yang digunakan polimerase Taq untuk memulai sintesis DNA pelengkap secara nyata menurun ketika ada ketidakcocokan primer 3'. Prinsip ini digunakan untuk secara selektif memperkuat urutan mutan dari campuran alel. Tingkat amplifikasi yang rendah dari urutan tipe liar bertindak sebagai kontrol internal yang biasanya memiliki nilai siklus ambang batas deteksi yang lebih tinggi daripada urutan mutan. Modifikasi metode PCR spesifik alel meliputi penggunaan probe ScorpionTM, probe asam nukleat peptik dan ko-amplifikasi pada PCR suhu denaturasi rendah (COLDPCR). Probe kalajengking menggunakan primer yang terhubung ke probe dengan fluorofoor dan pemadam [40]. Ketika amplifikasi PCR terjadi, probe mengikat ampikon yang menghasilkan pemisahan fluorofoor dari quencher yang mengarah ke sinyal fluoresen yang dapat dideteksi. Uji Therascreen berdasarkan prinsip ini adalah satu-satunya kit yang disetujui FDA AS yang saat ini ada di pasar untuk pengujian NRAS. COLD-PCR menggunakan tahap anil menengah yang memungkinkan pembentukan heteroduplex antara DNA mutan dan untai DNA tipe liar. Ketika suhu anil dari PCR berikutnya diturunkan, terjadi denaturasi urutan heteroduplex secara selektif sementara DNA tipe liar tetap beruntai ganda. Ini menghasilkan amplifikasi selektif dari alel mutan yang mungkin awalnya hadir pada frekuensi yang sangat rendah[15].

II.5.7 Metode berbasis hibridasi

Deteksi berbasis hibridisasi telah digunakan untuk membuat array deteksi mutasi NRAS yang dapat mendeteksi beberapa mutan NRAS dengan sensitivitas tinggi. DNA yang diperkuat dari langkah PCR didenaturasi dan dihibridisasi ke probe spesifik yang diimobilisasi dalam matriks padat. Salah satu metode berbasis larik

tersebut menggunakan primer PCR multipleks terbiotinilasi. Setelah hibridisasi dan beberapa langkah pencucian, konjugat streptavidin-peroksidase ditambahkan. Pada penambahan substrat berikutnya, chemiluminescence di tempat hibridisasi dideteksi menggunakan detektor. Hibridisasi probe kontrol yang digunakan dalam multipleks PCR membantu mengontrol zat yang mungkin mengganggu reaksi PCR. Ketika dilakukan dengan benar, tes berbasis array telah menunjukkan sensitivitas kurang dari 1%. Mereka juga dapat dirancang untuk mendeteksi spektrum mutasi. Meskipun metode ini memiliki sensitivitas tinggi, namun memiliki kelemahan bahwa probe spesifik menentukan spektrum mutasi yang dapat diuji dalam pengujian[15].

II.6 Aspek klinikopatologis yang berhubungan dengan mutasi NRAS Exon 3 pada penderita kanker kolorektal

II.6.1 Jenis kelamin

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa terdapat perbedaan genetik dan epigenetik tertentu antara jenis kelamin yang dapat menentukan risiko kanker kolorektal. Penelitian yang dilakukan pada 1505 pasien di Taipei Veteran General Hospital didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan spesifik jenis kelamin pada pasien kanker kolorektal yang berhubungan dengan mutasi gen BRAF, N-RAS dan MSI status tinggi. Pada penelitian ini didapatkan bahwa jenis kelamin wanita 8,8 kali lebih tinggi terkena kanker metilasi positif dibandingkan pasien pria. Penelitian ini menunjukkan bahwa perempuan memiliki lebih banyak mutasi gen yang signifikan dibandingkan laki-laki.[1] Hasil yang serupa juga didapatkan hasil dimana mutasi ini secara signifikan lebih tinggi pada perempuan (55,5% pasien wanita) daripada pada laki-laki (41% pasien pria). [2] Status hormon mungkin dapat berperan dalam perkembangan dan patogenesis kanker kolorektal, akan tetapi masih membutuhkan penelitian lebih lanjut.[1]

II.6.2 Umur

Penelitian sebelumnya oleh Russo et al didapatkan bahwa mutasi gen NRAS lebih sering terjadi pada orang yang lebih tua.[3] Hasil yang berbeda didapatkan pada penelitian terhadap 100 pasien karsinoma kolorektal di India dimana tidak terdapat hubungan antara mutasi NRAS, KRAS dan BRAF dengan usia. [4] Penelitian sebelumnya juga menunjukkan hal serupa dimana tidak terdapat hubungan antara usia dan frekuensi mutasi gen NRAS. [2]

II.6.3 Stadium dan grading

Saat ini, stadium kanker kolorektal TNM merupakan salah satu faktor prognosis yang penting. Akan tetapi, dalam beberapa kasus kanker kolorektal, tidak ditemukan hubungan antara stadium Tumor-Node-Metastasis (pTNM) patologis dan perilaku biologis dan klinis kanker kolorektal.[5]

Penelitian pada 408 pasien di *Meizhou People's Hospital* tahun 2019-2020 didapatkan bahwa mutasi NRAS lebih sering ditemukan pada pasien kanker kolorektal dengan metastasis jauh. Penelitian menunjukkan bahwa mutasi NRAS berhubungan dengan metastasis paru pada kanker kolorektal. Mutasi NRAS/KRAS/BRAF dapat memprediksi metastasis jauh yang lambat. Tumor dengan metastasis jauh memiliki presentasi mutasi yang lebih tinggi terhadap mutasi NRAS.[6] Penelitian lain menunjukkan bahwa metastasis yang jauh tidak berhubungan dengan mutasi KRAS, NRAS, BRAF atau PIK3CA. Kemungkinan mekanisme hubungan antara metastasis dan mutasi KRAS dan NRAS masih inkonsisten dan belum sepenuhnya jelas dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.[7]

II.6.4 Lokasi

Penelitian di India terkait dengan lokasi tumor, kombinasi prevalensi mutasi KRAS, NRAS dan BRAF ditemukan pada 46,1% dan 27,3% pada pasien karsinoma colon dan rectal, masing-masing.[4] Berdasarkan temuan penelitian di Yunani didapatkan bahwa tumor yang berlokasi di colon kanan (caecum, colon ascendens dan fleksura kanan) lebih sering mengalami mutasi KRAS, NRAS, serta mutasi BRAF dibandingkan dengan tumor yang berlokasi pada colon kiri (colon sigmoid, colon descendens dan fleksura kiri), dan hal ini mempengaruhi respon terhadap anti-EFGR moAbs. [8]

Kanker rectal dan sigmoid merupakan yang paling sering ditemukan, dengan atau tanpa mutasi gen. Mutasi paling sering ditemukan pada lokasi colon transversal dan colon ascendens. Mutasi juga lebih sering ditemukan pada sisi kanan dari colon daripada sisi kiri.[2] Penelitian yang dilakukan oleh Moreto terhadap 75 pasien kolorektal dengan mutasi gen RAS dan BRAF. Didapatkan bahwa pasien dengan tumor yang terletak pada sisi kanan colon lebih sering tidak merespons terhadap terapi berbahan dasar cetuximab atau

panitumab dibandingkan pasien dengan tumor pada sisi kiri colon. Jika kita berasumsi bahwa mutasi lebih sering terjadi di sisi kanan colon, maka hubungan ini mungkin disebabkan oleh masalah dalam mendeteksi mutasi gen RAS dan BRAF oleh karena heterogenitas atau rendahnya sensitivitas uji molekuler.[9]

II.6.5 Golongan darah

Antigen golongan darah pada membran eritrosit merupakan struktur molekuler yang juga ditemukan pada beberapa sel epitel, termasuk mukosa gastrointestinal. Sistem golongan darah ABO terdiri dari antigen (A, B, O, dan AB). Penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara antigen hereditas pada sistem golongan darah manusia dan risiko berkembangnya berbagai jenis kanker. Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan hubungan antara golongan darah ABO dan kemungkinan menderita kanker kolorektal. Antigen golongan darah terdapat pada lapisan luar eritrosit dan jaringan lain, seperti sel epitel traktus gastrointestinal. Glikokonjugat dalam antigen golongan darah ABO mungkin dapat berperan dalam mengubah adhesi interseluler, sinyal membran dan *surveillance* imun, yang kemungkinan dapat mempengaruhi tumorigenesis.[10, 11]

Penelitian didapatkan bahwa frekuensi tipe golongan darah yang tinggi diantara pasien kanker kolorektal adalah tipe A dan O, sementara tipe B memiliki risiko rendah terdapat kanker kolorektal. Hal ini kemungkinan oleh karena ekspresi biomarker tertentu yang berhubungan dengan golongan darah. Penelitian sebelumnya berasumsi bahwa tingginya tingkat kanker kolorektal pada golongan darah A kemungkinan berhubungan dengan perubahan gen, dan mungkin juga terkait dengan tingginya level substansi A dalam saliva pada orang dengan golongan darah tipe A. Substansi A pada saliva dapat mempengaruhi mukosa usus dan menyebabkan peningkatan kemungkinan perubahan malignansi pada kanker kolorektal.[12]

Pada penelitian yang dilakukan Genome Wide Association Studies (GWAS) telah menemukan adanya hubungan Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) pada lokus darah ABO dengan jumlah serum TNF alfa yang beredar. Dimana diketahui TNF alfa merupakan marker inflamasi yang berhubungan dengan keganasan kolorektal.

Pada penelitian di Karst Karacani Hospital, Turkey, yang meneliti tentang hubungan darah ABO dengan antigen Rh dengan kejadian kanker kolorektal yang melibatkan banyak factor etiologis. Hasil menunjukkan bahwa prevalensi golongan darah A dan B serta anti gen Rh kepositifan secara signifikan lebih tinggi diantara pasien CRC. Meskipun merupakan studi arsip, itu merupakan retrospektif desain, yang merupakan kelemahan dalam hal bukti. Antigen golongan darah ABO ditemukan oleh Karl Landsteiner pada tahun 1901. Anti gen golongan darah ABO dikodekan dalam kromosom 9q34. Meskipun antigen ini adalah komponen biokimia dari membrane eritrosit, mereka juga telah diidentifikasi dalam sel mukosa gastrointestinal. Ada sebuah hipotesis menarik tentang hubungan patofisiologis antara golongan darah ABO dan keganasan. Diregulasi aktivitas enzim glikosiltransferase A, dan glikosil transferase B, yang bertanggung jawab untuk sel pensinyalan dan adhesi antar sel yang diperantarai membrane selama respon imun, dapat meningkatkan kadar plasma factor von Willebrand, sehingga mengarah ke angiogenesis, apoptosis, dan tumor genesis. Selain itu, asosiasi ditunjukkan antara antigen ABO dan tumor necrotizing factor α , E-selectin, dan adhesi molekul antar satu, juga mendukung hipotesis bahwa pengaruh alel ABO pembentukan dan penyebaran keganasan. Sejalan dengan mekanisme patofisiologia ini, pertama menunjukkan hubungan antara kanker lambung dan golongan darah A antigen Rh pada tahun 1953.

Langkah pertama ini mengarah pada teori bahwa antigen golongan darah bisa menjadi factor predisposisi dalam banyak jenis keganasan dan terus membimbing studi baru dibidang ini bahkan hari ini. Pada jurnal Asia-Fasifik "ABO dan Rh Blood Groups and Risk of Colorectal Adenocarcinoma". Diskusi Gen ABO manusia terletak di kromosom 9q34.1-q34.2. Ada tiga bentuk alel utama, A, B, dan O (Hosoi, 2008). Produk gen utama adalah glikosiltransferase. Golongan darah ABO ditentukan oleh gugus karbohidrat, antigen A dan B, pada antibodi anti-A atau anti-B dalam serum. Namun, Antigen ABO juga diekspresikan pada permukaan banyak sel lain, seperti sel epitel. Perubahan pada struktur karbohidrat permukaan sel seperti antigen golongan darah ABH dapat mengubah interaksi sel-sel dan matriks ekstraseluler yang mungkin penting untuk perkembangan tumor (Dall'olio, 1996). Perubahan antigen ABO / Lewis dikaitkan dengan transformasi ganas

di beberapa neoplasma. Nakagoe et al. (2001) meneliti secara imunohistokimia ekspresi golongan darah ABO isoantigen dan Lewis terkait antigen karbohidrat dibandingkan sesuai dengan karakteristik seluler tumor. Studi mereka mengungkapkan bahwa isoantigen A dan siayl Lex dikaitkan dengan tumor tipe- pertumbuhan (tipe NPG) nonpolypoid dan tumor ini lebih cenderung mengembangkan metastasis kelenjar getah bening (Nakagoe et al., 2001).

Kemungkinan hubungan antara golongan darah ABO dan risiko beberapa keganasan epitel, termasuk kanker pankreas dan kanker lambung telah dilaporkan sebelumnya (Aird et al., 1953; Amundadottir et al., 2009; Wolpin et al., 2009; Greer et al., 2010; Iodice et al., 2010). Aird et al. (1953) melaporkan hubungan antara kanker lambung dan golongan darah ABO pada 1950-an. Frekuensi golongan darah A lebih besar dan O lebih rendah pada pasien dengan kanker lambung daripada populasi normal. Distribusi golongan darah A dan O adalah 44,8% dan 44,5% pada pasien dengan kanker lambung dan 39,8% dan 48,6% masing-masing pada kelompok kontrol (Aird et al., 1953). Setelah penelitian ini, Aird et al. (1954) meneliti hubungan golongan darah dengan CRC, payudara dan bronkus tetapi mereka tidak menunjukkan hubungan yang signifikan dengan golongan darah ABO (Aird et al., 1954) tetapi mereka tidak mengamati perbedaan dalam distribusi A dibandingkan non-A pada pasien dengan kanker lambung dan CRC (Iodice et al., 2010).