

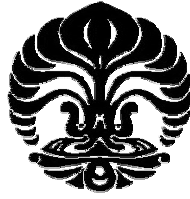
UNIVERSITAS INDONESIA

**ASOSIASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* “X”
KROMOSOM 15 DENGAN KERENTANAN TERHADAP
COLORECTAL CANCER SPORADIK BERDASARKAN
PENDEKATAN GENOMIK DI POPULASI MAKASSAR-
SULAWESI SELATAN**

TESIS

**PENDRIANTO
1006827303**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
NOVEMBER 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ASOSIASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* “X”
KROMOSOM 15 DENGAN KERENTANAN TERHADAP
COLORECTAL CANCER SPORADIK BERDASARKAN
PENDEKATAN GENOMIK DI POPULASI MAKASSAR-
SULAWESI SELATAN**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister
Farmasi**

**PENDRIANTO
1006827303**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
NOVEMBER 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan tindakan plagiarisme terkait dengan tesis saya ini maka saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 13 November 2012



Pendrianto

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : PENDRIANTO
NPM : 1006827303
Tanda Tangan : 
Tanggal : 23 Oktober 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : PENDRIANTO
NPM : 1006827303
Program Studi : ILMU KEFARMASIAN (BIOLOGI FARMASI)
Judul Skripsi : Asosiasi *Single Nucleotide Polymorphism* "X" Kromosom 15 dengan Kerentanan terhadap *Colorectal Cancer* Sporadik Berdasarkan Pendekatan Genomik di Populasi Makassar-Sulawesi Selatan

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Program Studi Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, MS

(*Amarila Malik*)

Pembimbing II : Dr. rer. nat Ivet Suriapranata

(*Ivet Suriapranata*)

Penguji I : Prof. Dr. Maksum Radji M.Biomed., Apt

(*Maksum Radji*)

Penguji II : Dr. Arry Yanuar M.Si.

(*Arry Yanuar*)

Penguji III : Prof. Dr. Effionora, MS., Apt.,

(*Effionora*)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 3 Desember 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas rahmat dan karunianya, sholawat dan salam semoga selalu terlimpah kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, para sahabat, dan ummatnya hingga akhir zaman. Alhamdulillah saya dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Asosiasi *Single Nucleotide Polymorphism* ”X” Kromosom 15 dengan Kerentanan terhadap *Colorectal Cancer* Sporadik Berdasarkan Pendekatan Genomik di Populasi Makassar-Sulawesi Selatan”. Penelitian dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Farmasi pada Program Studi Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, perkenankanlah saya dengan tulus hati mengucapkan terima kasih yang tak terhingga serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

- (1) Dr. Amarila Malik , MS, dan Dr. Ivet Suriapranata selaku dosen pembimbing I dan II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penelitian dan penyusunan tesis ini;
- (2) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia;
- (3) Prof. Dr. Effionora, MS., Apt., selaku ketua program studi S2 Ilmu Kefarmasian di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia yang telah memberikan dorongan untuk menyelesaikan program S2 Ilmu Kefarmasian
- (4) Tim penguji saya, Prof. Dr. Maksun Radji M.Biomed., Apt dan Dr. Arry Yanuar M.Si., yang telah banyak memberikan penilaian maupun saran-saran untuk perbaikan dan penyempurnaan tesis ini;
- (5) Dr. Andi Utama, atas dukungannya selama saya menjalani program beasiswa

S2 MRIN;

- (6) *Mochtar Riady Institute for Nanotechnology* (MRIN) yang telah memberikan beasiswa selama studi di Universitas Indonesia;
- (8) Orang tua saya, Mawardi (alm.) dan Ernawati serta Istri tercinta Siti Aisyah, Apt. dan putri pertama kami Zaila yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral;
- (9) Para sahabat di MRIN (Aker, Fabiola, Febi, Gladys, Indri, Ismail, Jeremiyah, Mariana, Marlinang, Pita, Rama, Raymond, Rinaldy, Riska, Shinta, Szeifoul, Tania, Widya, Young) dan sahabat di UI yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Pendrianto
Npm : 1006827303
Program Studi : Ilmu Kefarmasian (Biologi Farmasi)
Departemen : Farmasi
Fakultas : Farmasi
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

"Asosiasi *Single Nucleotide Polymorphism* "X" Kromosom 15 dengan Kerentanan terhadap *Colorectal Cancer* Sporadik Berdasarkan Pendekatan Genomik di Populasi Makassar-Sulawesi Selatan".

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 13 November 2012

Yang menyatakan



(Pendrianto)

ABSTRAK

Nama : Pendrianto
Program Studi : Ilmu Kefarmasian (Biologi Farmasi)
Judul : Asosiasi *Single Nucleotide Polymorphism* "X" Kromosom 15 dengan Kerentanan terhadap *Colorectal Cancer* Sporadik Berdasarkan Pendekatan Genomik di Populasi Makassar-Sulawesi Selatan

Insiden dan mortalitas dari *colorectal cancer* (CRC) terus meningkat. Beberapa metode skrining CRC umumnya bersifat invasif dan tidak nyaman. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dapat dimanfaatkan sebagai marker untuk skrining CRC dengan tingkat invasif yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi asosiasi antara SNP "X" dengan kerentanan terhadap CRC sporadik. Desain penelitian menggunakan studi potong lintang. Jumlah sampel dan daya uji pada kelompok CRC sporadik dan kontrol ditentukan dengan menggunakan Epi Info versi 3.5.1. DNA genomik diperoleh dari sampel darah kedua kelompok, kemudian dilakukan PCR dan *sequencing* untuk melacak genotip SNP "X" dengan ukuran amplikon 979 pb. Hasil analisis statistik menunjukkan nilai *P-Value* genotip TT terhadap Non TT sebesar 0,025 ($P < 0,05$), dengan *Odds Ratio* (OR) $0,193 < 0,420 < 0,911$. Setelah dikoreksi dengan *binary logistic regression*, didapatkan *P-Value* sebesar 0,047 dengan OR $0,188 < 0,431 < 0,988$. *P-Value* genotip GT terhadap Non GT 0,890 dengan OR $0,561 < 0,963 < 1,652$. *P-Value* genotip GG terhadap Non GG 0,076 dengan OR $0,949 < 1,628 < 2,793$. Hasil menunjukkan adanya asosiasi antara genotip TT pada SNP "X" dengan menurunnya kerentanan terhadap CRC sporadik. Studi lanjutan pada populasi lainnya di wilayah Indonesia perlu dilakukan untuk pemetaan pola variasi genetik di SNP "X", dan untuk mengetahui pengaruhnya di gen-gen terdekat yang berkorelasi terhadap CRC sporadik.

Kata Kunci : *Colorectal cancer*, *Single Nucleotide Polymorphism*, studi potong lintang
xiv+85 halaman : 15 gambar; 11 tabel
Daftar Pustaka : (1932-2012)

ABSTRACT

Name : Pendrianto
Study Program : Pharmaceutical Science (Biological Pharmacy)
Title : Association Single Nucleotide Polymorphism "X" Chromosome 15 with the Susceptibility to Sporadic Colorectal Cancer Based on Genomic Approach in Makassar-Sulawesi Selatan Population

The incidence and mortality of colorectal cancer (CRC) increase rapidly. Some CRC screening methods are invasive and generally uncomfortable. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) can be utilized as a marker for CRC screening with low level of invasiveness. This study aimed to validate the association between SNP "X" with susceptibility to sporadic CRC. This study is a cross-sectional study. Number of samples and power in CRC and control groups were determined using Epi Info v3.5.1. Genomic DNA were obtained from whole blood samples, and followed by PCR (979 bp amplicon) and direct sequencing to determine the genotype pattern. Statistical analysis showed that P-Value of genotype TT vs Non TT is 0.025 ($P < 0.05$), with Odds Ratio (OR) $0.193 < 0.420 < 0.911$. P-Value after adjustment using binary logistic regression was 0.047 with OR $0.188 < 0.431 < 0.988$. P-Value of genotype GT vs Non GT was 0.890 with OR $0.561 < 0.963 < 1.652$. P-Value of genotype GG vs Non GG was 0.076 with OR $0.949 < 1.628 < 2.793$. There was a significant association between TT genotype at the SNP "X" with decreased susceptibility to sporadic CRC. Further study will be needed to identify genetic variation patterns in the SNP "X" in other populations in Indonesia region, and to investigate its effect to the nearest genes and its correlation to sporadic CRC.

Key word : Colorectal cancer, Single Nucleotide Polymorphism, cross-sectional study

xiv+85 page : 15 figures; 11 tables

References : (1932-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Hasil Penelitian	5
1.5. Hipotesis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. <i>Colorectal Cancer</i> (CRC)	6
2.2. Penyebab	7
2.2.a. Faktor Internal	7
2.2.b. Faktor Eksternal	7
2.3. Tanda dan Gejala	8
2.3. Patogenesis	9
2.4.a. Instabilitas Mikrosatelit	10
2.4.b. Destabilisasi Genomik	11
2.4.c. Mutasi Somatik di Gen MMR (<i>Mismatch Repair</i>) pada CRC Sporadik	17
2.5. Tahapan (<i>Staging</i>) pada Tumor	18
2.6. Histopatologi Tumor	21
2.7. Skrining pada Orang-orang dengan Resiko CRC	22
2.7.a. Fleksibel Sigmoidoskopi	25
2.7.b. Kolonoskopi	26
2.7.c. <i>Barium Enema with Air Contrast</i>	27
2.7.d. FOBT (<i>Fecal Occult Blood Testing</i>)	27
2.7.e. <i>Computed Tomographic Colonography</i> (CTC)	28
2.8. SNP	29
2.8.1. Kegunaan SNP	30
2.9. <i>Genome-Wide Association Study</i> (GWAS)	31
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	36
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2. Pra Penelitian	36

3.3. Sampel.....	37
3.4. Alat dan Bahan.....	38
3.5. Desain Penelitian.....	38
3.6. Tahapan Kerja	39
3.6.1. Isolasi DNA.....	39
3.6.2. <i>Polymer Chain Reaction</i> (PCR).....	40
3.6.3. <i>Gel Electrophoresis</i>	41
3.6.4. Purifikasi DNA	41
3.6.5. <i>Cycle Sequencing</i> dan Presipitasi EDTA/ Etanol.....	42
3.6.6. <i>Sequencing</i>	43
3.7. Rencana Analisis.....	43
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1. Desain Primer dan Optimasi PCR.....	45
4.2. Sampel.....	46
4.3. Desain Penelitian	46
4.4. PCR, <i>Gel Electrophoresis</i> , dan Analisis Statistik.....	50
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	56
5.1. Kesimpulan	56
5.2. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Anatomi kolon dan rektum normal	6
Gambar 2.2	Peningkatan laju pembelahan sel dan penurunan laju apoptosis yang dapat memicu perkembangan tumor	9
Gambar 2.3.	Beberapa gen dan faktor pertumbuhan yang memicu CRC.....	11
Gambar 2.4.	Pemodelan genetik pada CRC.....	13
Gambar 2.5.	Domain fungsional dan lokasi mutasi pada protein APC	15
Gambar 2.6.	Frekuensi dan distribusi mutasi germinal dan somatik	15
Gambar 2.7.	Skematik jalur efektor dalam karsinogenesis kolorektal.....	16
Gambar 2.8.	Sistem klasifikasi (staging) pada kanker kolorektal.....	18
Gambar 2.9.	Contoh kategori T1-T4 dan N1-N2.....	20
Gambar 2.10.	Contoh kategori M1	21
Gambar 2.11.	Tingkatan (<i>grade</i>) histopatologi.....	22
Gambar 2.12.	Alat fleksibel sigmoidoskopi dan kolonoskopi	26
Gambar 2.13.	<i>Microarray GeneChip</i> dari <i>Affymetrix Inc.</i>	30
Gambar 4.1.	Gel elektroforesis hasil optimasi <i>annealing step</i> pada proses PCR	46
Gambar 4.2.	Pengkuran besaran sampel yang akan digunakan dalam penelitian	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Klasifikasi TNM pada CRC karsinoma	19
Tabel 3.1.	Preparasi pada Buffer AW1 dan AW2.....	39
Tabel 3.2.	Preparasi pada pelarut protease.....	39
Tabel 3.3.	Komposisi reagen pada proses PCR	40
Tabel 3.4.	Komposisi reagen pada PCR <i>digestion</i>	42
Tabel 3.5.	Komposisi reagen pada proses <i>cycle sequencing</i>	42
Tabel 4.1.	Karakteristik sampel pada kelompok CRC dan Kontrol.....	49
Tabel 4.2.	Nilai <i>P-Value</i> pada HWE.....	50
Tabel 4.3.	Nilai <i>P-Value</i> dan nilai OR pada genotip TT dan Non TT.....	51
Tabel 4.4.	Nilai <i>P-Value</i> dan nilai OR pada genotip GT dan Non GT.....	52
Tabel 4.5.	Nilai <i>P-Value</i> dan nilai OR pada genotip GG dan Non GG.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skematik penelitian CRC di MRIN	67
Lampiran 2.	Panduan skrining	68
Lampiran 3.	Jadwal kerja	70
Lampiran 4.	Sekuen referensi SNP "X" di kromosom 15	71
Lampiran 5.	Kartu insiden	72
Lampiran 6.	Tahapan isolasi DNA dengan protokol putar (<i>spin protocol</i>) menggunakan QIAamp DNA <i>blood mini kit</i> (Qiagen)	73
Lampiran 7.	Tahapan purifikasi menggunakan <i>multi screen PCR₉₆ filter</i> <i>plate</i>	76
Lampiran 8.	Presipitasi EDTA/ etanol	77
Lampiran 9.	Contoh tabulasi dan perhitungan <i>Chi-Square Test</i> , <i>Odds Ratio</i> , dan HWE	78
Lampiran 10.	Desain primer	80
Lampiran 11.	Lembaran data primer F dan R	81
Lampiran 12.	Alur proses pemilihan sampel pada kelompok kontrol dan kelompok CRC	82
Lampiran 13.	Perhitungan jumlah sampel dalam masing-masing strata yang diambil secara proporsional	83
Lampiran 14.	Elektroforesis gel hasil PCR pada kelompok Kontrol dan CRC	84
Lampiran 15.	Elektroferogram hasil sekuensing pada tiga genotip	85

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

The International Agency for Research on Cancer (IARC) melaporkan bahwa pada tahun 2008 penyakit kanker kolorektal (*colorectal cancer, CRC*) menempati urutan ketiga pada laki-laki yaitu sebanyak 663.000 kasus (10.0%) dan urutan kedua pada wanita yang berjumlah 571.000 kasus (9.4%) dari total penyakit kanker di seluruh dunia (tidak termasuk *non-melanoma skin cancer*) (IARC, 2008a). Hampir 60% dari kasus tersebut terdapat pada kawasan negara maju. Kematian akibat kanker kolorektal diperkirakan sekitar 608.000 di seluruh dunia dan sebanyak 8% dari total kematian akibat kanker yang membuat kanker ini berada pada urutan keempat sebagai penyebab kematian (IARC, 2008b).

Menurut *World Health Organization (WHO)*, kematian akibat kanker di dunia terus meningkat dan mencapai jumlah 11 juta pada tahun 2030 (WHO, 2008). Di Indonesia, penyakit CRC menempati urutan kedua setelah kanker paru-paru pada laki-laki dan kanker payudara pada perempuan. Pada kedua gender, kanker ini menempati urutan ketiga setelah kanker payudara dan paru-paru (IARC, 2008c).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pendeteksian penyakit ini pada stadium awal melalui beberapa skrining dapat menurunkan resiko kematian (Levin *et al.*, 2008; Cree, 2011; Bilbao *et al.*, 2012). Skrining merupakan metode yang paling dianjurkan, terutama bagi orang-orang yang memiliki resiko terhadap CRC. Pendekatan skrining dapat menjadi alternatif pencegahan pengembangan suatu penyakit keganasan seperti pada kanker.

Secara konvensional, pendeteksian penyakit CRC pada stadium awal dilakukan menggunakan fleksibel sigmoidoskopi, dan kolonoskopi yaitu memasukkan kamera fiber optik untuk melihat ada tidaknya polip yang terdapat pada kolon dan rektum (Flamini *et al.*, 2009). Walaupun secara umum metode ini aman, namun ujung alat ini dapat melukai dinding kolon dan menyebabkan luka serius sehingga terkadang memerlukan operasi. Selain itu, penggunaan alat ini

membutuhkan operator yang terampil dan pembersihan kolon yang baik, sehingga adopsi metode ini untuk skrining lini pertama menjadi kendala.

Metode deteksi lainnya yaitu *Double Contrast Barium Enema* (DCBE), dapat memvisualisasikan keseluruhan kolon setelah pemberian barium yang diikuti dengan pemberian udara pada kolon dan rectum (Flamini *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2009). Prosedur ini dapat mengidentifikasi polip berukuran besar (>1 cm) dan kanker. Dari segi biaya, prosedur ini lebih murah dibandingkan dengan kolonoskopi. Namun kekurangan metode ini adalah kurang sensitif untuk mendeteksi polip yang berukuran kecil (<1 cm). Selain itu, pemeriksaan memakan waktu yang lebih lama, dikarenakan keadaan kolon yang harus bersih dari feses untuk mengurangi kesalahan interpretasi. Pasien juga bisa merasa tidak nyaman karena harus meminum pencahar sehari sebelum pemeriksaan dan supositoria pada hari pemeriksaan (Beck, 2003; Flamini *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2009).

Hardcastle *et al.* (1996) dan Kronborg *et al.* (1996) mengembangkan skrining CRC dengan melihat profil darah pada feses yang disebut dengan *Fecal Occult Blood Testing* (FOBT). Umumnya polip atau kanker pada kolorektal memiliki permukaan pembuluh darah yang mudah rusak oleh desakan feses yang menyebabkan keluarnya sejumlah kecil darah dalam feses. Uji FOBT telah dikembangkan untuk mendeteksi darah dalam feses melalui beberapa pendekatan. Pendekatan yang paling sering digunakan adalah pengukuran aktivitas hemoglobin peroksidase. Akan tetapi, penyakit seperti wasir, fisur anal, tukak lambung, peradangan usus besar kronis, penyakit refluks gastroesofagus, dan *Crohn's disease* juga dapat memperlihatkan darah pada feses dan menghasilkan uji FOBT positif palsu. Disamping itu, beberapa makanan dan obat-obatan dapat memberikan pengaruh pada uji FOBT seperti aspirin atau obat anti inflamasi non steroid (NSAIDs), asupan vitamin C yang berlebihan, dan beberapa sayuran serta buah-buahan yang dapat memberikan hasil uji negatif palsu (Levin *et al.*, 2008; Moses, 2009; Flamini *et al.*, 2009). Oleh karena itu, jika uji FOBT menunjukkan hasil positif maka dibutuhkan uji lanjutan yaitu kolonoskopi untuk evaluasi lebih lanjut (Levin *et al.*, 2008). Hal ini dikarenakan FOBT bukan untuk diagnosa CRC.

Computed Tomographic Colonography (CTC) atau disebut juga sebagai koloskopi virtual, adalah pemeriksaan pencitraan dari seluruh usus besar dan

rektum dengan tingkat invasif yang rendah. Prosedur ini dapat mengamati keseluruhan abdomen sehingga dapat mengamati polip ekstrakolonik (Levin *et al.*, 2008), dan sensitifitasnya yang sebanding dengan kolonoskopi (Pickhardt *et al.* 2004; Halligan *et al.*, 2005; Farrar *et al.*, 2006). Namun kekurangan metode ini adalah sensitifitas dan spesifisitasnya yang sangat bergantung pada ukuran polip, prosedur persiapannya yang serupa dengan kolonoskopi, dan kontroversi terkait dengan efek dosis radiasinya terhadap resiko kanker (Pickhardt *et al.*, 2003; Amis *et al.*, 2007; Brenner & Hall, 2007).

Pendekatan dengan tingkat invasif yang lebih rendah dari beberapa metode skrining di atas namun memberikan hasil uji yang positif adalah *Genome Wide Association Study* (GWAS). GWAS adalah suatu pendekatan untuk menemukan variasi genetik (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) yang berasosiasi dengan penyakit tertentu yang melibatkan seluruh genom dari sejumlah individu (NHGRI, 2011). GWAS telah banyak dikembangkan sebagai metode skrining tidak saja pada pasien stadium dini namun juga bagi orang-orang yang berisiko berdasarkan riwayat keluarga. Studi tersebut berguna untuk menemukan SNP yang berkontribusi terhadap penyakit yang kompleks seperti kanker, penyakit infeksi (AIDS, leprosy, hepatitis), autoimun, *neuropsychiatric* dan berbagai penyakit lainnya (NHGRI, 2011; Fareed & Afzal, 2012). Jika terdapat asosiasi antara penyakit dengan SNP yang ditemukan, maka dapat memberikan informasi tambahan yang berguna untuk mengembangkan strategi yang lebih baik untuk mendeteksi, mengobati dan mencegah penyakit tersebut dan dapat menjadikan SNP tersebut sebagai target pengembangan farmakogenomik yang relevan untuk terapi obat.

Beberapa GWAS telah dilakukan terhadap pasien CRC dan kontrol sehat yang telah dievaluasi untuk mengetahui pola polimorfisme dalam gen kandidat dan gen lainnya yang tersebar di seluruh genom pada beberapa populasi (Kim *et al.*, 2010; Holst *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2011). Namun penelitian di atas sebagian besar menggunakan sampel pasien yang memiliki riwayat keluarga dengan penyakit kanker, padahal sebagian besar penderita CRC merupakan CRC sporadik (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008; Bedeir & Krasinskas, 2011; dan Fearon, 2011). Untuk itu, pada penelitian

pendahuluan tahun 2009 di *Mochtar Riady Institute for nanotechnology* (MRIN) telah dilakukan GWAS untuk mengidentifikasi SNP yang dikaitkan dengan kerentanan terhadap CRC sporadik menggunakan SNP *array* pada populasi orang yang ada di Makassar, Sulawesi Selatan (Lampiran 1) (data tidak dipublikasi).

Saat itu, dilakukan pemetaan dan karakterisasi SNP dan *Copy Number Variation* (CNV) pada CRC sporadik menggunakan platform Affymetrix 5.0 dengan sampel berjumlah 69 pasien CRC sporadik dan 98 sampel orang sehat (kontrol). Sampel tersebut berasal dari Rumah Sakit Wahidin dan Ibnu Sina yang berada di kota Makassar, Sulawesi Selatan. Kriteria inklusi pada kelompok CRC adalah pasien yang terdiagnosa CRC sporadik dan kriteria eksklusi adalah pasien non CRC.

Dari hasil penelitian pendahuluan tersebut, ditemukan beberapa SNP yang umum dan beberapa SNP yang jarang (*rare SNP*) yang berasosiasi dengan kerentanan terhadap CRC sporadik. Salah satu SNP yang memiliki asosiasi kerentanan terhadap CRC sporadik adalah SNP “X” yang terletak pada kromosom 15. Huruf “X” mewakili nomor SNP, namun dalam tesis ini disembunyikan karena terkait dengan hak atas kekayaan intelektual dari MRIN. Sejauh ini belum ada publikasi ilmiah yang melaporkan bahwa SNP “X” memiliki asosiasi kerentanan terhadap CRC sporadik. Untuk itu, dalam penelitian ini dilakukan validasi studi asosiasi antara SNP “X” dengan kerentanan terhadap CRC sporadik menggunakan jumlah sampel yang lebih banyak dan metode sampling yang lebih baik. Skematik penelitian CRC dapat dilihat pada Lampiran 1.

1.2. Perumusan Masalah

Insiden dan mortalitas yang berkaitan dengan penyakit CRC terus meningkat. Beberapa metode skrining yang dilakukan untuk pendeteksian penyakit ini umumnya bersifat invasif dan memberi rasa tidak nyaman bagi pasien, apalagi jika diterapkan bagi orang-orang sehat yang memiliki resiko CRC. Untuk itu diperlukan pendekatan metode skrining dengan tingkat invasif yang rendah, yaitu dengan studi variasi genetik pada SNP yang diasosiasikan dengan kerentanannya terhadap CRC. Salah satu SNP yang ditemukan dalam penelitian

pendahuluan adalah SNP “X” yang memiliki asosiasi terhadap CRC sporadik dan belum pernah dipublikasikan dalam jurnal ilmiah sebelumnya.

1.3. Tujuan Penelitian

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk mengumpulkan data variasi genetik dari SNP “X” dan mengetahui asosiasi antara SNP “X” dengan kerentanan terhadap CRC sporadik pada populasi orang Indonesia yang ada di Makassar.

Secara khusus, penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi hasil penelitian pendahuluan tahun 2009 di MRIN, mengetahui perbedaan pola variasi genetik pada SNP “X”, mengetahui apakah ada asosiasi antara SNP “X” dengan kerentanan terhadap CRC sporadik, dan mengetahui sejauh mana dugaan resiko CRC sporadik yang ditimbulkan oleh variasi genetik pada SNP “X”.

1.4. Manfaat Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini bermanfaat untuk melengkapi koleksi data SNP yang memiliki asosiasi terhadap CRC sporadik dan berguna dalam studi asosiasi lanjutan. Memberikan informasi yang berguna untuk keperluan skrining lini pertama penyakit CRC sporadik di laboratorium klinik atau rumah sakit kanker, memberikan solusi metode penapisan non invasif pada penyakit ini serta memberikan kenyamanan yang lebih baik dibanding dengan metode konvensional yang sudah ada, jika telah berhasil ditemukan SNP-SNP yang berasosiasi dengan CRC sporadik. Disamping itu dapat pula memberikan informasi bagi penelitian selanjutnya, khususnya pada gen yang berasosiasi dengan SNP “X”.

1.5. Hipotesis

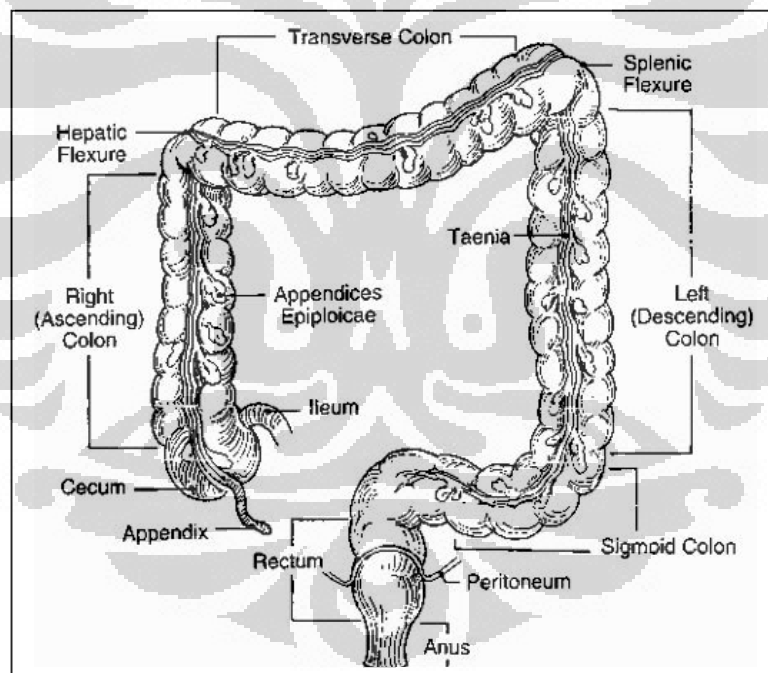
Hipotesa pada penelitian ini yaitu terdapat asosiasi antara SNP “X” dengan kerentanan terhadap CRC sporadik, dan memberikan hasil yang sama dengan penelitian pendahuluan sehingga memvalidasi hasil penelitian pendahuluan tersebut.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Colorectal Cancer (CRC)*

The American Cancer Society (ACS) mendefinisikan bahwa kanker adalah sel-sel abnormal yang membelah secara tidak terkontrol dan menginvasi jaringan normal didekatnya. Ketika sel kanker mampu masuk ke dalam pembuluh darah atau pembuluh limfa, sel tersebut dapat menuju bagian tubuh lainnya dan dapat berproliferasi serta mendesak sel-sel atau jaringan normal di tempat baru tersebut. Proses tersebut dinamakan metastasis (ACS, 2011).



Gambar 2.1. Anatomi kolon dan rektum normal

(Sumber: Beck, 2003)

Kanker kolorektal adalah pertumbuhan abnormal sel yang terjadi pada kolon dan/ atau rektum (Gambar 2.1) (Arjoso *et al.*, 2008). Kanker kolorektal

tumbuh secara perlahan dan memerlukan waktu antara 15-20 tahun untuk berkembang. Penyakit ini mulai timbul sejak dewasa muda sampai usia lanjut, namun sering dijumpai pada usia sekitar 30-40 tahun dan 60-70 tahun.

2.2 Penyebab

Penyebab CRC belum diketahui secara pasti. Namun CRC memiliki beberapa faktor resiko berupa faktor internal dan eksternal (Arjoso *et al.*, 2008; Jemal *et al.*, 2010; Randi *et al.*, 2010; dan ACS, 2011):

2.2.a. Faktor Internal

Faktor internal dapat berupa mutasi yang diturunkan/ herediter (faktor genetik) seperti *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) serta *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC); hormon; kondisi kekebalan tubuh; dan mutasi yang terjadi selama proses metabolisme yang tidak terkait dengan sindrom kanker herediter dan didefinisikan sebagai kanker kolorektal sporadis (*sporadic colorectal cancer*). Faktor resiko lainnya adalah adanya riwayat anggota keluarga yang menderita penyakit polip, CRC, radang usus besar kronik (kolitis ulseratif), dan akromegali. Disamping itu latar belakang etnis atau ras juga dapat meningkatkan faktor resiko terkena penyakit ini. Beberapa ras atau etnis seperti orang Amerika keturunan Afrika dan keturunan Bangsa Yahudi di Eropa Timur (*Ashkenazi Jews*) memiliki faktor resiko yang lebih tinggi terhadap kanker kolorektal bila dibandingkan dengan etnis lainnya. Usia juga menjadi faktor penting karena kemungkinan seseorang menderita kanker kolorektal meningkat setelah usia 50 tahun, dan 9 dari 10 orang dengan kanker kolorektal berusia lebih dari 50 tahun.

2.2.b. Faktor Eksternal

Faktor eksternal yang dapat berkontribusi terhadap CRC sporadik antara lain adalah gaya hidup tidak sehat, adanya paparan organisme patogen seperti

bakteri dan virus, bahan kimia, dan radiasi. Faktor resiko yang terkait dengan gaya hidup (*life style*) seperti kebiasaan menelan makanan yang tidak dikunyah secara sempurna, tingginya frekuensi konsumsi daging merah (100 gr/ hari), makanan tinggi lemak, konsumsi makanan yang diolah dengan pewarna sintetik dan pengawet, alkohol, dan penggunaan hormon sebagai terapi serta rendahnya asupan kalsium dan folat, konsumsi sayuran dan buah yang mengandung antioksidan dan serat (Arjoso *et al.*, 2008; Beck *et al.*, 2009). Zat besi sebagai pengoksidasi (prooksidan), N-nitroso, heterosiklik amin, dan *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH) sebagai hasil metabolisme daging merah juga dapat menjadi pencetus terjadinya kanker (karsinogen) (Beck *et al.*, 2009).

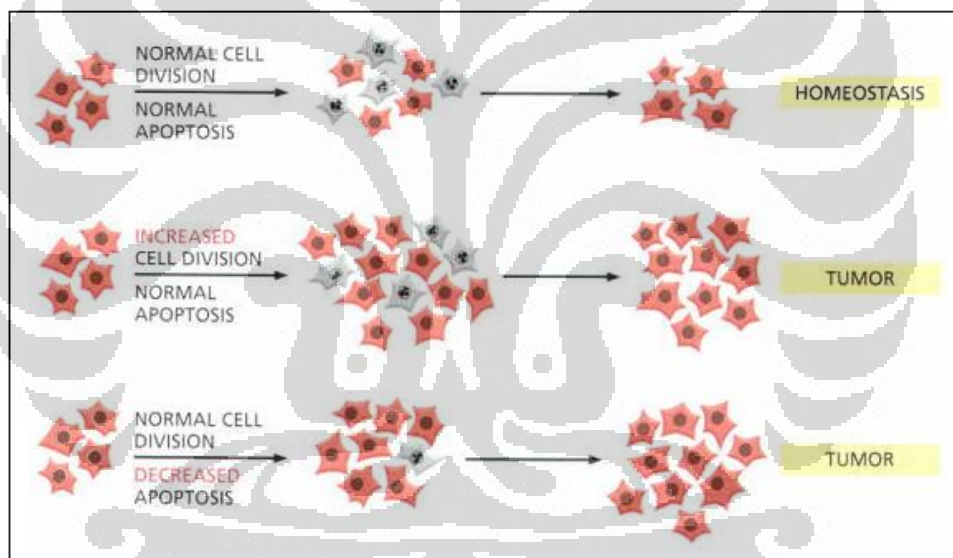
Selain itu, kebiasaan merokok dan meminum alkohol, menderita penyakit diabetes melitus tipe 2, kurangnya olahraga, kelebihan berat badan (obesitas), dan kolesistektomi menjadi faktor resiko yang dapat menyebabkan kanker (Beck *et al.*, 2009; *The American Cancer Society*, 2011). Sitomegalovirus (CMV) merupakan salah satu virus yang menyebabkan penyakit kolitis ulseratif yang merupakan faktor resiko kanker kolorektal (Lawlor dan. Moss, 2010).

2.3. Tanda dan Gejala

Arjoso *et al.* (2008) dan *American Cancer Society* (2011) memaparkan beberapa tanda dan gejala yang patut diwaspadai dan menjadi indikasi kanker kolorektal. Tanda dan gejalanya antara lain adalah perubahan dalam kebiasaan buang air besar seperti diare, sembelit, atau defekasi yang berlangsung lebih dari beberapa hari. Adanya perasaan ingin buang air besar, namun tidak kunjung keluar setelah lama di dalam toilet. Terjadinya pendarahan dubur, tinja berwarna gelap, atau adanya darah dalam feses (*bloody stool*). Selain itu, pada stadium lanjut terkadang ditandai dengan kram atau sakit perut, perut membesar, muntah, mudah lelah dan lesu, turunnya nafsu makan, serta turunnya berat badan.

2.4. Patogenesis

Peningkatan laju mutasi tiap sel dapat meningkatkan probabilitas kanker. Orang yang mengalami obesitas memiliki resiko lebih tinggi terkena kanker dibandingkan dengan orang dengan berat badan normal. Hal ini kemungkinan karena jumlah dan laju pembelahan sel meningkat oleh adanya faktor pertumbuhan (*growth factors*) yang distimulasi secara berlebihan (Markowitz & Bertagnolli, 2009; Sung & Bae, 2010; Wang & DuBois, 2012). Pada jaringan dewasa yang normal, sel-selnya dapat berproliferasi secara terus-menerus dan jumlahnya tetap karena jumlah sel yang mati sama dengan sel yang dibentuk yang merupakan mekanisme homeostasis tubuh.



Gambar 2.2. Peningkatan laju pembelahan sel dan penurunan laju apoptosis yang dapat memicu perkembangan tumor

(sumber: Alberts *et al.*, 2008)

Kematian sel terprogram (*Programmed Cell Death*, PCD) melalui apoptosis memainkan peranan penting dalam menjaga keseimbangan tersebut, jika jumlah sel yang hidup terlalu banyak maka laju apoptosis akan meningkat untuk membuang sel yang berlebihan jumlahnya. Kemampuan ini hilang pada sebagian

besar jenis kanker dan menyebabkan terjadinya pertumbuhan tumor (tumorigenesis) seperti yang terlihat pada Gambar 2.2.

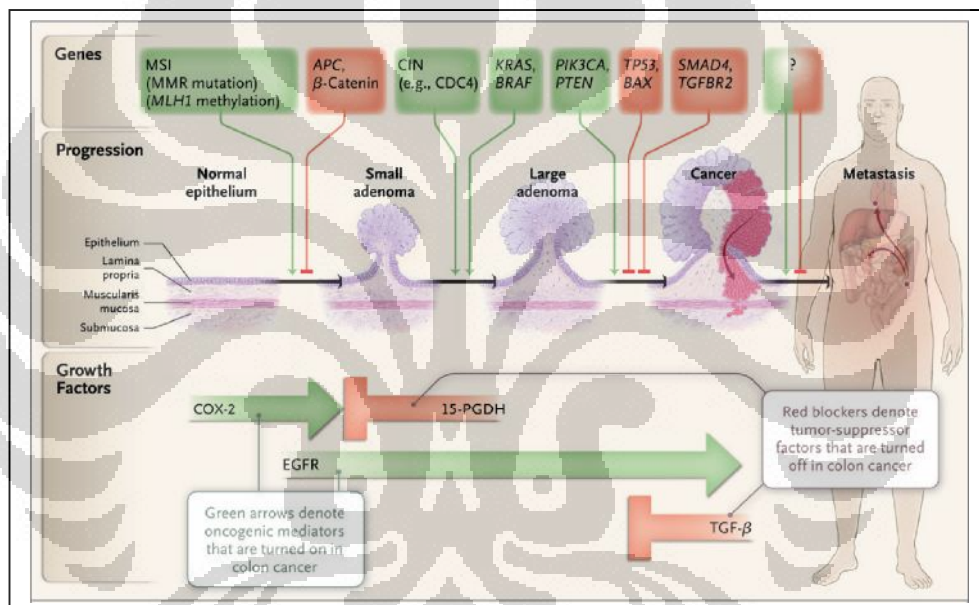
2.4.a. Instabilitas Mikrosatelit

Mikrosatelit adalah 1 sampai 4 sekuen nukleotida yang dapat berulang 10-100 kali dalam sekuen DNA genomik (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008). Mikrosatelit yang paling umum pada manusia adalah pengulangan dinukleotida sitosin-adenin (yaitu CACACACACA). Sifat keterulangan yang alami dari urutan tersebut cenderung dapat berubah selama replikasi DNA. Dalam kondisi normal kesalahan-kesalahan ini diperbaiki oleh enzim yang mereparasi DNA selama replikasi sel. Enzim-enzim dan proses perbaikan DNA ini sangat *highly conserved*, artinya gen penyandi enzim dan perangkat untuk perbaikan DNA tersebut tidak berubah sepanjang filogenesis. Fenomena hilang atau bertambahnya nukleotida karena proses reparasi yang merusak urutan mikrosatelit disebut instabilitas mikrosatelit (*microsatellite instability*, MSI). Akibatnya, perubahan panjang mikrosatelit menjadi dasar yang menandai terjadinya kerusakan sistem reparasi DNA.

Berbeda dengan HNPCC, CRC sporadik yang terkait dengan tingginya instabilitas mikrosatelit (*MSI-High*) tidak membawa mutasi germinal pada gen reparasi DNA-nya namun mekanisme yang mendasari biasanya adalah *epigenetic silencing* dari gen (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008; Kim, Lee, & Sidransky, 2010). Epigenetik adalah perubahan yang mempengaruhi fungsi gen dengan cara memetilasi residu sitosin dari daerah yang kaya akan sekuen sitosin-guanin (sekitar 0,5-2 kb), yang disebut pulau CpG ('p' adalah singkatan dari ikatan fosfodiester antara dua nukleotida tersebut) di dalam sekuen promotor (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008; Fearon, 2011). Selain itu, modifikasi histon karena metilasi yang menyebabkan terjadinya perubahan struktur kromatin dan mempengaruhi ekspresi gen (Wade & Kikyo, 2002) juga merupakan epigenetik. Sebagai akibatnya, tidak terjadi transkripsi gen karena terjadinya *silencing* gen. Metilasi pada CRC yang terkait dengan MSI-H paling sering terjadi pada daerah promotor *human MutL Homolog 1* (hMLH1) (Kane *et al.*, 1997).

2.4.b. Destabilisasi Genomik

Destabilisasi genomik merupakan langkah awal dalam perkembangan CRC sporadik. Stoler *et al.* (1999) mengatakan bahwa ketidakstabilan genomik merupakan penyebab karsinogenesis kolorektal. Model genetik dari CRC yang diusulkan oleh Fearon & Vogelstein (1990) bertumpu pada asumsi bahwa sebagian besar CRC muncul dari lesi adenomatosa yang sudah ada sebelumnya dan akumulasi beberapa gen yang termutasi, serta beberapa faktor pertumbuhan (Jänne & Mayer, 2000; Markowitz & Bertagnolli, 2009; Walther *et al.*, 2009; Pritchard & Grady, 2011) (Gambar 2.3).



Keterangan: CIN (*Chromosomal Instability*), EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), 15-PGDH (*15-Prostaglandin Dehydrogenase*), dan TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), SMAD4 (*Mothers Against Decapentaplegic homolog* (SMAD) family member 4), TGFBR2 (*TGF- β Receptor type II*), PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), COX-2 (*Cyclooxygenase 2*). CDC4 (*Cell Division Control*), BAX (*Bcl-2-Associated X protein*).

Gambar 2.3. Beberapa gen dan faktor pertumbuhan yang memicu CRC

(sumber: Markowitz & Bertagnolli, 2009)

Hanya sekitar 2-6% dari CRC berasosiasi dengan HNPCC atau APC, karena sebagian besar merupakan CRC sporadik (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008; Bedeir & Krasinskas, 2011; dan Fearon, 2011). Sebagian besar CRC sporadik mengikuti jalur instabilitas kromosom atau *Chromosomal Instability*

(CIN), namun sekitar 15% dari CRC sporadik tersebut menunjukkan jalur yang berbeda dan ini terkait dengan defisiensi gen *Mismatch Repair* (MMR) saat replikasi DNA (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008; Bedeir & Krasinskas, 2011).

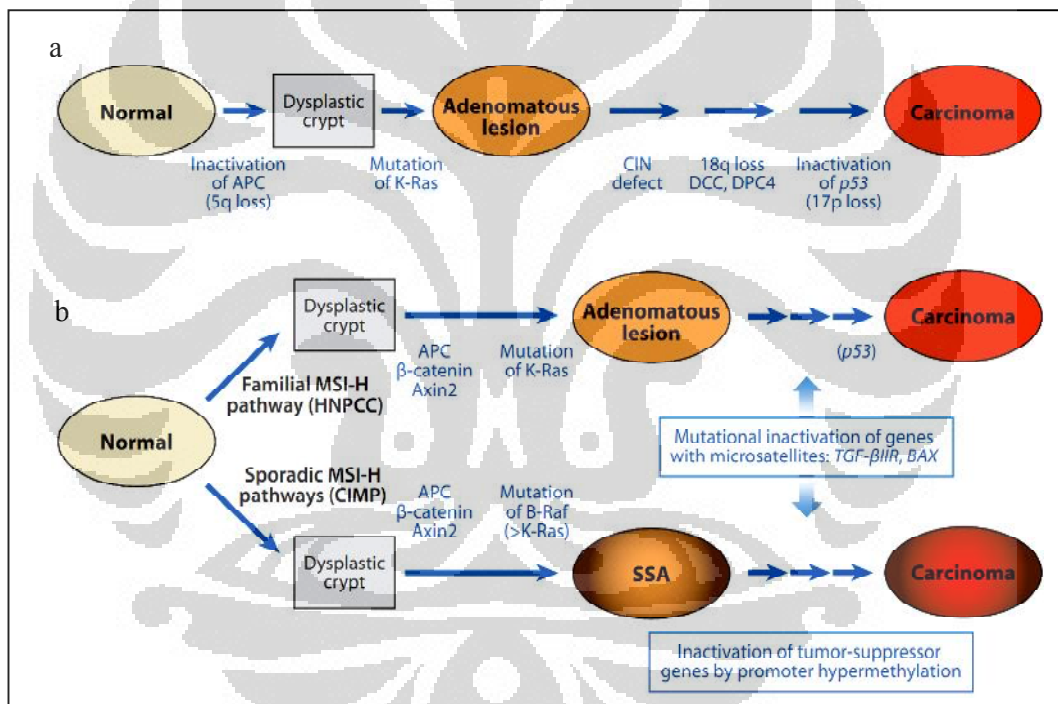
Kombinasi dari lesi dan akumulasi gen yang termutasi tersebut menyebabkan perubahan dari epitel normal menjadi karsinoma metastasis dengan beberapa tahapan yaitu epitel hiperplastik, adenoma kecil, adenoma besar, adenoma akhir, dan karsinoma (Fearon & Vogelstein, 1990; Markowitz & Bertagnolli, 2009). Tanda tanya pada Gambar 2.3 menunjukkan belum teridentifikasinya perubahan genetik dan epigenetik yang spesifik pada progresi menjadi metastasis. Gen-gen yang termutasi pada langkah-langkah dalam proses tersebut adalah APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) pada kromosom 5, KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma*) pada kromosom 12, BRAF (*V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*), PI3KCA (*Phosphoinositide-3-Kinase Catalytic Alpha*), TP53 (*Tumor Protein 53*) pada 17p, gen DCC (*deleted in colorectal cancer*) dan DPC4 (*Deleted in Pancreatic Cancer locus 4*) yang didelesi pada kromosom 18 (Rajagopalan *et al.*, 2002; Wood, *et al.*, 2007; Kurashina *et al.*, 2008; Lea *et al.*, 2009; Berg *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2010; Fearon, 2011; Roock *et al.*, 2011).

Delesi yang terjadi pada alel di kromosom 18q telah diidentifikasi pada sekitar 70% dari CRC, khususnya pada CRC dengan metastasis (Fearon & Vogelstein 1990). Mutasi titik dari gen DCC telah diidentifikasi oleh Cho *et al.* (1994) pada sekitar 6% dari CRC sporadik. Menurut Takayama *et al.* (2006) bahwa SMAD4 dan SMAD2 merupakan gen supresor tumor yang berada pada kromosom 18q, dan SMAD4 secara kausal dikaitkan dengan perkembangan kanker.

Setiap mutasi gen yang dijelaskan dalam model terjadi pada frekuensi tinggi hanya pada tahap tertentu dari perkembangan tumor. Pengamatan ini adalah dasar untuk menetapkan urutan relatif dari mutasi yang terjadi dalam jalur multistap (Gambar 2.4). Meskipun beberapa perubahan terjadi pada CRC telah dijelaskan, hanya beberapa kasus saja yang memiliki semua perubahan tersebut.

Para peneliti memiliki pemahaman bahwa jalur sinyal onkogen, *tumor suppressor gene* (TSG), mutasi genetik atau epigenetik mungkin menyebabkan

efek pada fenotip seperti yang terlihat dalam Gambar 2.4. Selain skema yang ditunjukkan pada Gambar 2.4a, jalur molekuler karsinogenesis kolorektal lain juga telah diusulkan oleh Jass (2007) dan Vilar & Gruber (2010) yaitu dua skenario alternatif yang dapat dilihat pada Gambar 2.4b. Sekitar ~2-4% dari kasus HNPCC yang timbul dari mutasi germinal gen MMR mungkin memiliki beberapa kesamaan dengan kasus CIN dalam hal mutasi yang mendasari pembentukan lesi adenomatosa, seperti mutasi APC dan KRAS. Namun setelah inaktivasi gen MMR dalam lesi adenomatosa, progresi untuk menjadi karsinoma mungkin terjadi lebih cepat pada HNPCC dibandingkan dengan kebanyakan kasus sporadis.



Keterangan: (a) diusulkan oleh Fearon & Vogelstein (1990); dan (b) diusulkan oleh Jass (2007) dan Vilar & Gruber (2010)

Gambar 2.4. Pemodelan genetik pada CRC

(sumber: Fearon, 2011)

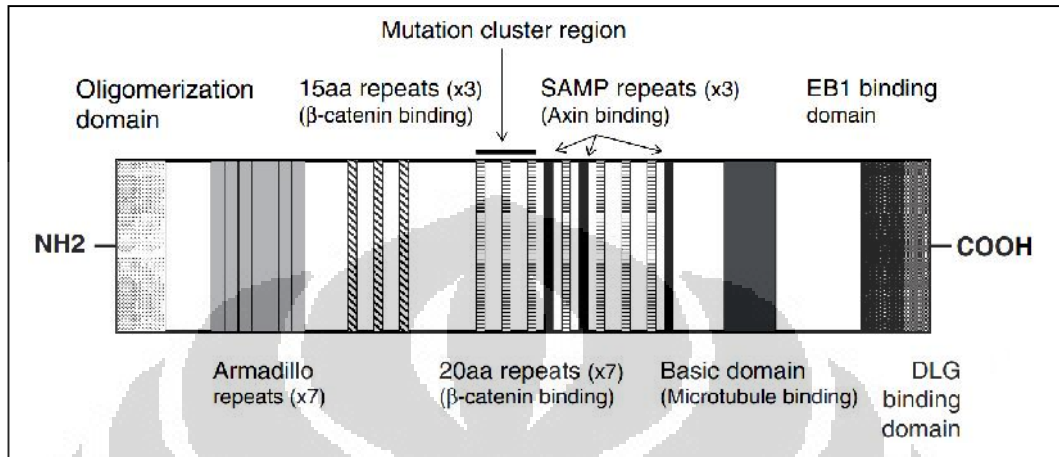
Perubahan molekuler terkait dengan progresi tumor mungkin melibatkan gen-gen tertentu seperti *Transforming Growth Factor β type II Receptor*

(TGF β IIR), *Activin type II Receptor* (ACVR2), dan *Bcl-2-Associated X protein* (BAX) yang daerah kodingnya mengandung sekuen berulang (Gambar 2.4b atas). Pada sekitar 10-12% dari CRC sporadis dengan MSI-H, kanker tersebut mungkin timbul dari *Sessile Serrated Adenomas* (SSA) terutama yang berada pada kolon proksimal, dan beberapa lesi molekuler yang berhubungan dengan genesis SSA dan perkembangan selanjutnya menjadi CRC yang berbeda dari CRC dengan MSI-H tipe CIN dan HNPCC (Gambar 2.4b bawah). Lesi molekuler ini termasuk mutasi pada BRAF (Rajagopalan *et al.*, 2002) dan *silencing* pada gen supresor tumor tertentu yang terjadi sebagian melalui hipermetilasi promotor dan histon yang menyebabkan terjadinya perubahan struktur kromatin (Wade & Kikyo, 2002; Fearon, 2011).

Inaktivasi gen APC adalah peristiwa molekuler pertama pada kanker kolorektal sporadis. Protein APC berfungsi menstabilkan mikrotubul dan menjaga stabilitas kromosom, sehingga inaktivasi gen APC menyebabkan rusaknya benang-benang spindel pada proses mitosis dan gagalnya segregasi kromosom dan menghasilkan aneuploidi yang menyebabkan kanker (Galiatsatos & Foulkes, 2006). Selain peran kunci pada FAP dan beberapa sindrom (*Gardner syndrome*, *Turcot's syndrome*, *Peutz-Jeghers syndrome*, *Juvenile polyposis syndrome*), gen APC juga memainkan peran dalam CRC sporadis (Fearon, 2011). Mutasi somatik dengan gen APC yang inaktif diidentifikasi pada sekitar 60-80% dari CRC sporadik adenoma dan karsinoma (Kinzler & Vogelstein, 1996; Narayan & Roy, 2003; Segditsas & Tomlinson, 2006; dan Polakis, 2007).

Protein APC berjumlah 2843 asam amino pada dan memiliki beberapa situs pengikatan. Pada bagian terminal amino terdapat domain yang mengatur oligomerisasi protein APC. Sekuen berulang yang mirip dengan protein yang dimiliki oleh *Drosophila armadillo* dan beberapa vertebrata, homolog dengan β -*catenin* (sehingga disebut *armadillo repeats*) yang terdapat pada sepertiga akhir dari ujung terminal amino. Sekuen 20 asam amino yang berulang secara bebas berperan dalam memediasi pengikatan pada β -*catenin* dan situs pengikatan untuk protein *Axin* (sekuen berulang SAMP) yang berada pada daerah dua pertiga dari sekuen protein APC. Pada bagian terminal-C dari APC terdapat sekuen yang

terlibat dalam pengikatan mikrotubul dan interaksi dengan protein EB1 dan DLG(Gambar 2.5).

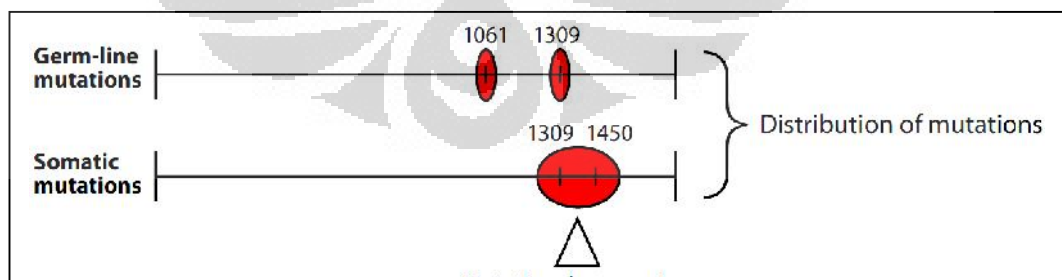


Keterangan: SAMP (*Ubiquitin-like Small Archaeal Modifier Protein*), EB1 (*End Binding 1*), DLG (*Discs Large*)

Gambar 2.5. Domain fungsional dan lokasi mutasi pada protein APC

(Sumber: Gryfe, 2009)

Frekuensi dan distribusi mutasi germinal pada pasien dengan profil FAP berada pada *coding region* dari APC, yaitu dua titik mutasi pada kodon 1061 dan 1309 yang menghasilkan protein APC yang tidak berfungsi (Gambar 2.6).

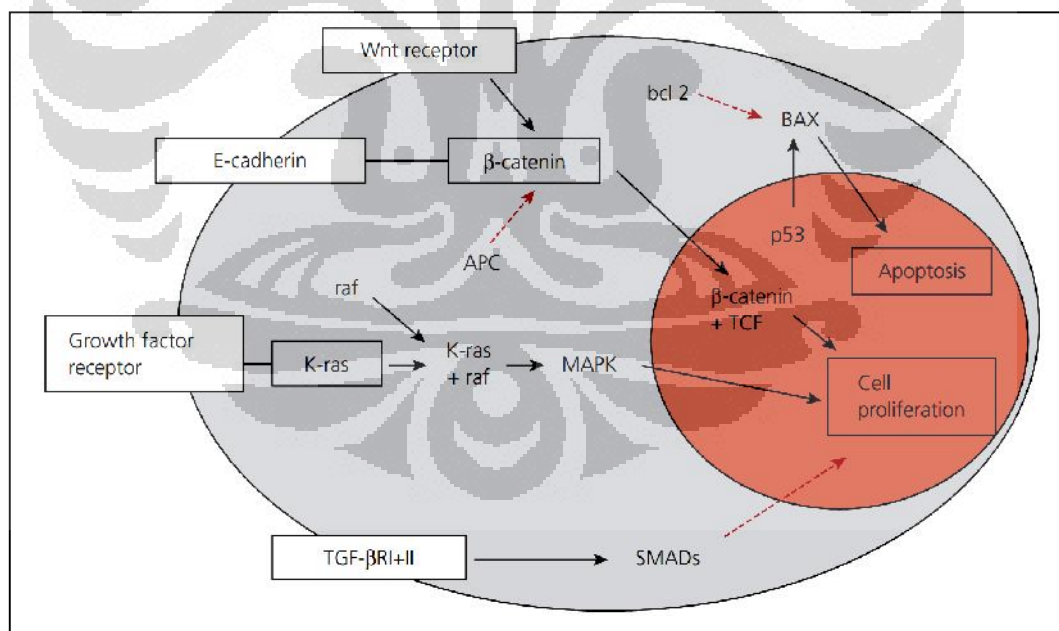


Gambar 2.6. Frekuensi dan distribusi mutasi germinal dan somatik gen APC

(sumber: Fearon E R. 2011)

Bodmer (2006) mengidentifikasi mutasi somatik dari gen APC pada sebuah daerah kluster mutasi (*mutation cluster region*, MCR) yang merupakan hampir 60% dari semua mutasi somatik. Dalam MCR terdapat dua *hot spot* mutasi somatik yaitu pada kodon 1309 dan 1450 (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008; Fearon, 2011). Mutasi gen APC dalam MCR menghasilkan protein APC yang terpotong dan tidak memiliki semua situs pengikatan axin dan kecuali satu atau dua dari 20 asam amino dari situs pengikatan β -catenin (Fearhead *et al.*, 2001).

Mutasi K-ras telah ditemukan sebanyak 15-68% pada kolorektal adenoma sporadis dan sebanyak 40-65% dari semua jenis kanker. Mayoritas mutasi k-ras terjadi akibat mutasi titik yang terjadi di kodon 12, 13 dan 64. Protein K-ras yang bermutasi mengaktifkan berbagai jalur efektor termasuk raf/ MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), JNK (*Jun N-terminal kinase*) dan PI3-K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) yang mengarah pada peningkatan pertumbuhan konstitutif sel kanker (Gambar 2.7).



Keterangan: Panah hitam dan merah berturut-turut menunjukkan efek positif dan negatif. Wnt (*Wingless pathway*), TCF (*T-Cell Factor*).

Gambar 2.7. Skematik jalur efektor dalam karsinogenesis CRC

(sumber: Pignatelli, Banu & Melegh, 2008)

Sekitar 50% dari CRC sporadis dengan mutasi gen APC dilaporkan menunjukkan adanya mutasi pada β -*catenin*, yang menyebabkan terjadinya akumulasi β -*catenin* (Takayama *et al.*, 2006). Mutasi pada gen P53 telah diidentifikasi sebanyak 40-50% dari CRC sporadik. Seperti yang diprediksi oleh model Knudson bahwa dibutuhkan mutasi gen bialelik untuk mempromosikan perkembangan tumor pada gen supresor tumor, sehingga kedua alel APC harus menjadi inaktif seperti yang ditemukan pada pasien dengan profil FAP dan CRC sporadik (Fearon, 2011).

Mutasi gen P53 terjadi pada saat transisi dari adenoma menjadi kanker. Sebagian besar mutasi terjadi di daerah yang *highly conserved* dari ekson 5 sampai 8 dan mayoritas adalah mutasi misens (GC menjadi AT). Frekuensi mutasi p53 lebih tinggi pada bagian distal dibanding dengan bagian proksimal pada kanker kolon dan rektal (Pignatelli, Banu & Melegh, 2008). Pasien kanker dengan mutasi p53 memiliki profil penyakit yang parah dan waktu kelangsungan hidup yang lebih pendek dari pasien tanpa mutasi p53.

2.4.c. Mutasi Somatik di Gen MMR (*Mismatch Repair*) pada CRC Sporadik

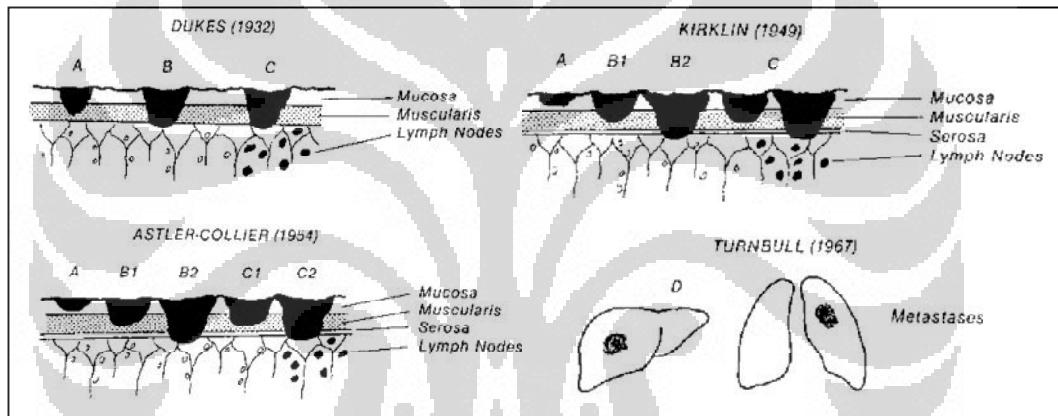
Mutasi germinal secara *de novo* atau mutasi somatik pada gen MMR telah ditemukan pada sebagian kecil dari CRC sporadik dengan MSI-H (Thibodeau *et al.* 1993; Rustgi, 2007; Vilar & Gruber, 2010). Pengamatan ini menunjukkan bahwa kerusakan pada gen MMR mungkin terdapat pada sebagian besar CRC, terlepas dari ada atau tidaknya riwayat keluarga yang terkena penyakit yang sama.

Hilangnya ekspresi gen MLH1 melalui hipermetilasi promotor mungkin merupakan kontributor kunci untuk mayoritas kasus CRC sporadik dengan MSI-H yang tidak muncul pada HNPCC (Rustgi, 2007; Vilar & Gruber, 2010). Asosiasi antara metilasi dari wilayah promotor gen MLH1 dan metilasi dari banyak sekuens gen lainnya secara kolektif disebut *CpG Island Hypermethylation Phenotype* (CIMP). Berkenaan dengan kasus MSI-Low, bukti mutasi germinal atau somatik pada gen MMR, dan faktor-faktor serta mekanisme yang berkontribusi terhadap fenotip tersebut hingga saat ini belum diketahui. Kasus

MSI-L tidak berbeda secara signifikan dari kasus *Microsatellite Stable* (MSS) (Fearon, 2011).

2.5. Tahapan (*Staging*) pada Tumor

Tumor mampu berkembang dan melakukan penetrasi sampai pada dinding usus, pelibatan nodus limfe, dan metastasis. Dua kemampuan pertama hanya dapat ditentukan melalui analisis patologi dari spesimen hasil operasi. Beberapa sistem tahapan (*staging*) tumor telah diajukan untuk keperluan prognosis.



Gambar 2.8. Sistem klasifikasi (*staging*) pada CRC

(Sumber: Beck, 2003)

Cuthbert Dukes, seorang patologis dari Rumah Sakit St. Marks London pada tahun 1932 membuat sebuah sistem tahapan tumor dan membagi lesi kanker ke dalam tiga kategori. Pertama, kategori A adalah lesi yang menembus bagian muskularis propria pada dinding usus. Kedua, kategori B adalah lesi yang telah menembus dinding usus tanpa metastasis, dan terakhir yaitu kategori C adalah lesi yang telah mencapai nodus limfe (metastasis) (Gambar 2.8). Kirklin *et al.* (1949) memodifikasi sistem Dukes dengan beberapa tambahan yaitu kategori A adalah lesi yang terbatas pada bagian mukosa usus, membagi kategori B menjadi dua

yaitu B1 lesi yang hanya mencapai bagian muskularis propria dan B2 yang menembus dinding usus (Gambar 2.8). Astler dan Coller (1954) membagi kategori C menjadi C1 yaitu penetrasinya sama dengan B1 namun dengan metastasis ke nodus limfatik dan C2 yaitu penetrasi seperti B2 namun dengan metastasis ke nodus limfatik. Turnbull *et al.* (1967) menambahkan kategori D pada sistem klinikopatologis yaitu kanker dengan metastasis ke organ lain.

Pada tahun 2000 WHO memperkenalkan sistem TNM (Tumor, Nodul, Metastasis) yang digunakan dalam sistem tahapan kanker pada sistem pencernaan, termasuk kanker kolorektal (Tabel 2.1). Sistem TNM didasarkan pada luasnya tumor (T), luasnya penyebaran ke kelenjar getah bening (N), dan adanya metastasis (M) (NCI, 2010). Angka ditambahkan ke setiap huruf untuk menunjukkan ukuran atau luas tumor primer dan tingkat penyebaran kanker. Pada Gambar 2.9; dan 2.10 ditampilkan ilustrasi dari klasifikasi TNM.

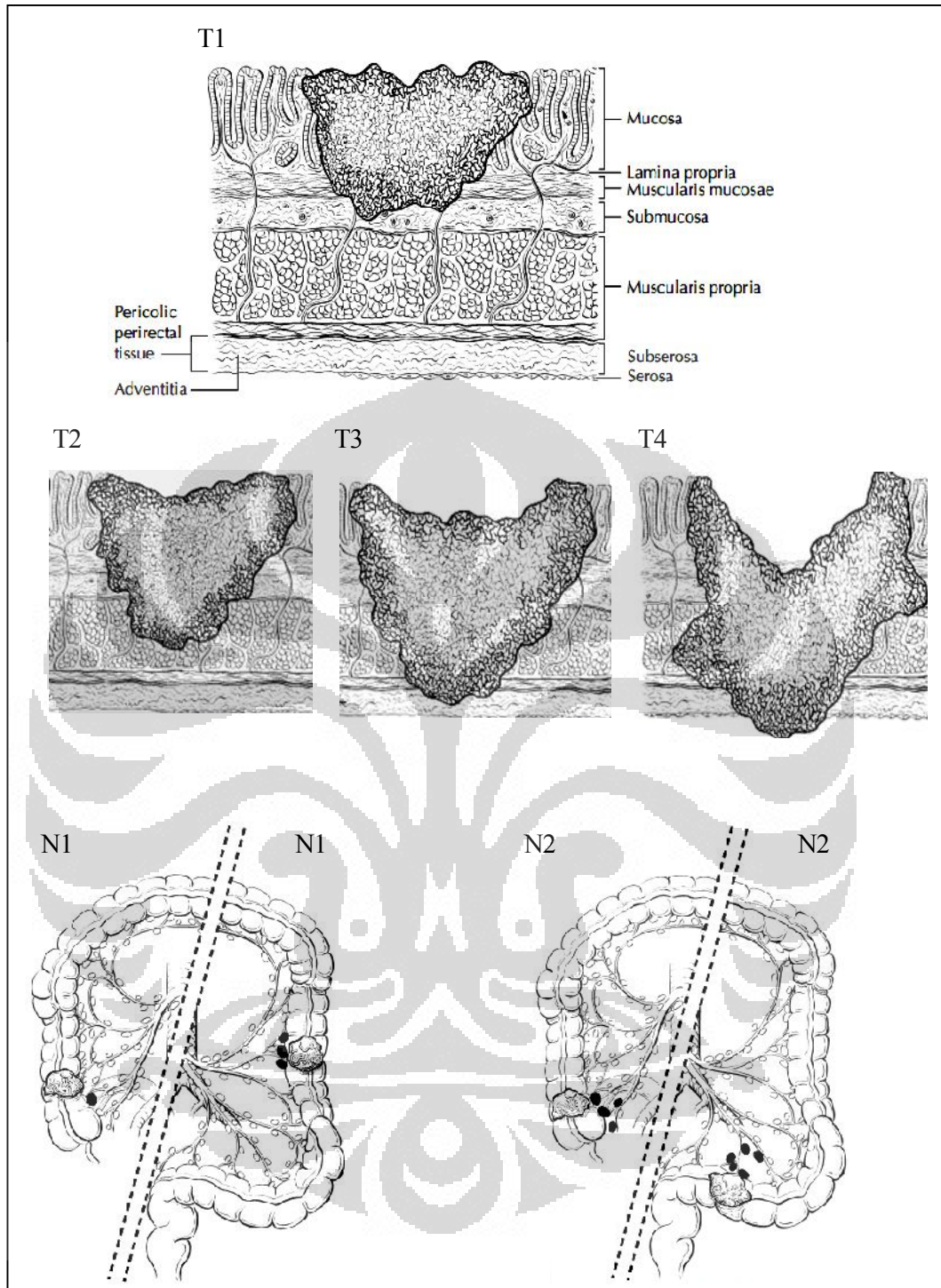
Tabel 2.1. Klasifikasi TNM pada CRC karsinoma.

T – Primary Tumour		M – Distant Metastasis	
<i>TX</i>	<i>Primary tumour cannot be assessed</i>	<i>MX</i>	<i>Distant metastasis cannot be assessed</i>
<i>T0</i>	<i>No evidence of primary tumour</i>	<i>M0</i>	<i>No distant metastasis</i>
<i>Tis</i>	<i>Carcinoma in situ; intraepithelial or invasion of lamina propria¹</i>	<i>M1</i>	<i>Distant metastasis</i>
<i>T1</i>	<i>Tumour invades submucosa or into non-peritonealized pericolic or perirectal tissues</i>		
<i>T2</i>	<i>Tumour invades muscularis propria</i>		
<i>T3</i>	<i>Tumour invades through muscularis propria into subserosa</i>		
<i>T4</i>	<i>Tumour directly invades other organs or structures and/or perforates visceral peritoneum²</i>		
N – Regional Lymph Nodes		Stage Grouping	
<i>NX</i>	<i>Regional lymph nodes cannot be assessed</i>	<i>Stage 0</i>	<i>Tis N0 M0</i>
<i>N0</i>	<i>No regional lymph node metastasis</i>	<i>Stage I</i>	<i>T1 N0 M0</i> <i>T2 N0 M0</i>
<i>N1</i>	<i>Metastasis in 1 to 3 regional lymph nodes</i>	<i>Stage II</i>	<i>T3 N0 M0</i> <i>T4 N0 M0</i>
<i>N2</i>	<i>Metastasis in 4 or more regional lymph nodes</i>	<i>Stage III</i>	<i>Any T N1 M0</i> <i>Any T N2 M0</i>
		<i>Stage IV</i>	<i>Any T Any N M1</i>

¹ This includes cancer cells confined within the glandular basement membrane (intraepithelial) or lamina propria (intramucosal) with no extension through muscularis mucosae into submucosa.

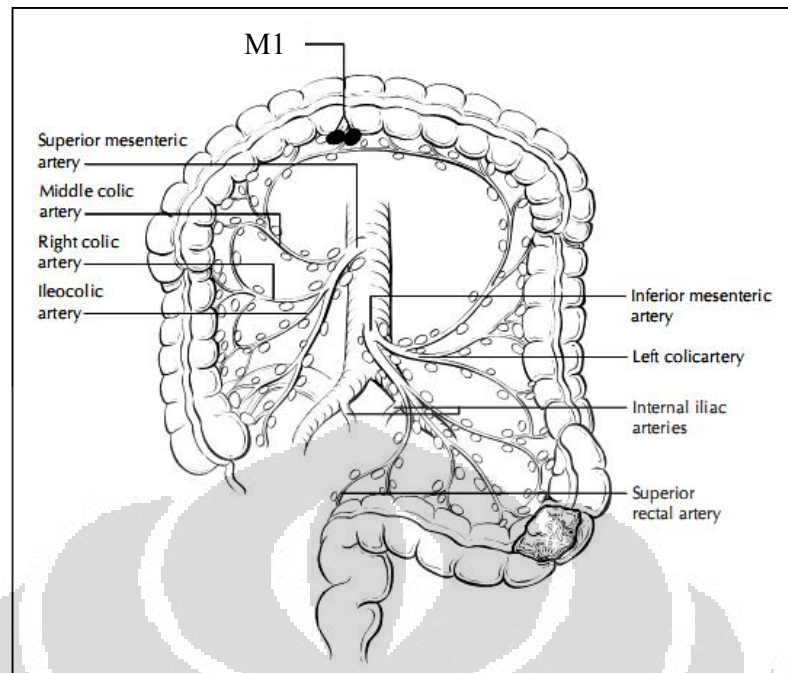
² Direct invasion in T4 includes invasion of other segments of the colorectum by way of the serosa, e.g. invasion of sigmoid colon by a carcinoma of the cecum.

(Sumber: Hamilton & Aaltonen, 2000)



Gambar 2.9. Contoh kategori T1-T4 dan N1-N2.

(Sumber: Greene *et al.*, 2006)

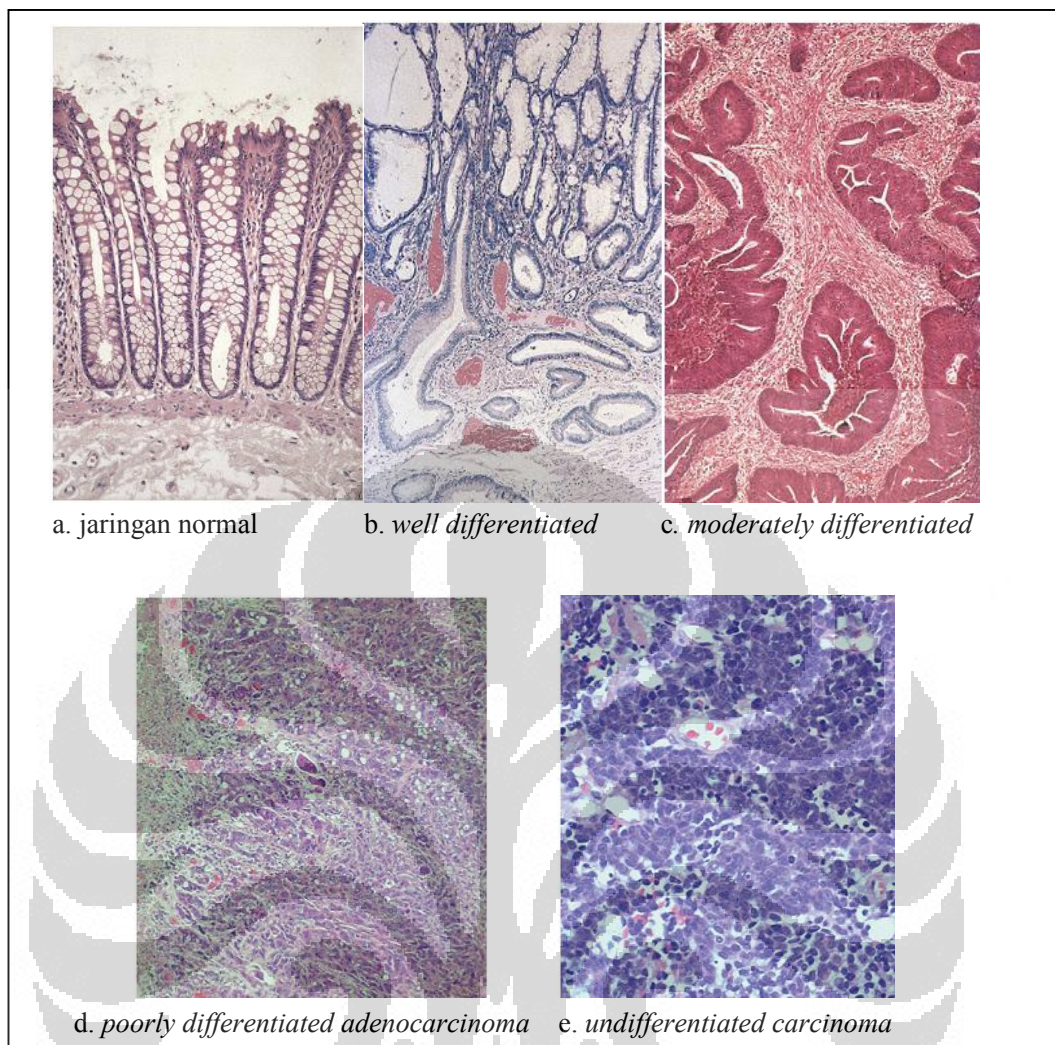


Gambar 2.10. Contoh kategori M1.

(Sumber: Greene *et al.*, 2006)

2.6. Histopatologi Tumor

Terdapat empat tingkatan pada adenokarsinoma yang dibagi berdasarkan pada besarnya kelenjar dan mukus yang dihasilkan yaitu *well differentiated*, *moderately differentiated*, *poorly differentiated*, dan *undifferentiated adenocarcinoma*. Lesi pada sel tumor dengan *Well differentiated (grade 1)* memiliki struktur glandular atau kelenjar sekitar >95%, *moderately differentiated (grade 2)* memiliki kelenjar berkisar 50-95%, *poorly differentiated (grade 3)* memiliki kelenjar antara 5-50%; dan *undifferentiated (grade 4)* dengan kelenjar kurang dari 5% (Gambar 2.11) (Hamilton & Aaltonen, 2000). Tingkatan ini dapat pula dibagi menjadi dua tingkatan yaitu rendah yang merupakan gabungan *well* dan *moderately differentiated* dan tinggi yaitu gabungan *poorly differentiated adenocarcinomas* dan *undifferentiated carcinomas*.



Gambar 2.11. Tingkatan (*grade*) histopatologi

(Sumber: Talbot *et al.*, 2007)

2.7. Skrining pada Orang-orang dengan Resiko CRC

Sebuah konsorsium yang terdiri dari 5 badan yaitu *American College of Gastroenterology*, *American Gastroenterological Association*, *The American Society of Colon and Rectal Surgeons*, *American Society for Gastrointestinal Endoscopy*, and *Society of American Gastrointestinal Endoscopic Surgeons* telah merespon permintaan dari *The Agency for Health Care Policy and Research* untuk mengembangkan panduan secara nasional di Amerika Serikat pada skrining CRC

(Beck *et al.*, 2009). Beck *et al.* (2009) menyebutkan bahwa sebuah panel yang terdiri dari 16 tenaga kesehatan profesional interdisipliner telah membuat rekomendasi berupa panduan bagi para tenaga kesehatan dan publik dalam melakukan skrining pada penyakit ini. Panduan ini membagi pasien ke dalam 2 kelompok yaitu individu dengan resiko rendah dan tinggi terkena CRC. *The American Cancer Society* (ACS) kemudian merevisi panduan tersebut dengan membagi pasien ke dalam 3 kelompok resiko yaitu rendah, menengah, dan tinggi dengan rekomendasi skrining spesifik untuk masing-masing kelompok (ACS, 2011). Panduan skrining tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2.

Pasien dengan faktor resiko rendah terhadap CRC adalah mereka yang tidak memiliki gejala, berusia 50 tahun atau lebih, memiliki keluarga yang bukan pada derajat pertama (saudara kandung, orang tua, anak) dengan riwayat CRC, dan tidak memiliki faktor penyebab CRC (umumnya berjumlah 65-75%). Seseorang dengan faktor resiko menengah terhadap CRC adalah mereka yang memiliki satu atau lebih saudara dengan CRC (umumnya berjumlah 20-30%). Pasien dengan faktor resiko tinggi terhadap CRC adalah mereka yang secara genetik (FAP dan HNPCC) dapat terkena CRC dan mereka yang pernah terkena penyakit radang usus (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD).

Pasien dengan resiko rendah dan tanpa gejala CRC dianjurkan melakukan skrining pada usia 50 tahun. Strategi skrining meliputi uji FOBT tiap tahun, fleksibel sigmoidiskopi setiap 5 tahun, *Double Contrast Barium Enema* (DCBE) dan kolonoskopi setiap 5-10 tahun. Jika hasil uji FOBT positif, maka harus dilanjutkan dengan evaluasi keseluruhan kolon dengan uji DCBE atau kolonoskopi. Jika hasil uji FOBT negatif, maka uji dengan fleksibel sigmoidiskopi direkomendasikan untuk dilakukan setiap 5 tahun. Hal ini karena beberapa polip tumbuh dan berkembang menjadi kanker dalam periode 5 tahun. Jika ditemukan polip maka harus dilakukan biopsi, sedangkan jika pada diagnosa patologis ditemukan adenoma maka direkomendasikan untuk melakukan kolonoskopi. Namun jika ditemukan polip hiperplastik maka tidak diperlukan uji tambahan.

Prosedur skrining pada individu dengan resiko menengah terhadap CRC antara lain adalah jika usia kerabat yang menderita CRC lebih muda dari 55 tahun, maka individu tersebut mulai menjalani skrining (kolonoskopi) setiap 5 tahun

pada usia 40 tahun atau 10 tahun lebih awal dari kerabatnya yang menderita CRC. Jika usia kerabatnya lebih dari 55 tahun, maka skrining dilakukan setiap 5-10 tahun pada usia 50 tahun atau 10 tahun lebih awal dari kerabatnya tersebut.

Pasien yang memiliki resiko tinggi seperti riwayat keluarga dengan CRC harus mendapatkan konseling genetik dan menjalani uji genetik FAP dan HNPCC. Pada pasien yang memiliki riwayat keluarga dengan FAP, direkomendasikan untuk melakukan uji fleksibel sigmoidoskopi setiap tahun yang dimulai pada usia pubertas (12-14 tahun). Pada pasien yang memiliki riwayat keluarga dengan HNPCC, uji endoskopi harus dimulai pada usia 20-25 tahun atau setidaknya 10 tahun lebih muda dari keluarga yang menderita CRC. Prosedur endoskopi yang dimaksud adalah kolonoskopi yang dilakukan setiap 2 tahun sampai pasien berusia 40 tahun. Setelah usia 40 tahun, kolonoskopi dilakukan setiap tahun. Jika hasil uji genetik negatif, maka observasi pada pasien dilakukan hanya pada saat kondisi kesehatan (pada saluran pencernaannya) menghendaki demikian. Pada pasien yang memiliki riwayat IBD seperti pankolitis dan colitis ulseratif diharuskan untuk uji kolonoskopi setiap 1-2 tahun setelah 8 tahun dan 15 tahun terkena penyakit tersebut dan uji dilakukan terbatas pada kolon bagian kiri saja.

Di Indonesia, skrining CRC dilakukan mengacu pada Panduan Klinis Nasional Pengelolaan Karsinoma Kolorektal (PKNPKK) yang dibuat oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Bedah Digestif Indonesia (IKABDI) pada tahun 2004. Panduan ini dibagi ke dalam dua kriteria yaitu pada populasi umum dan populasi yang memiliki resiko tinggi. Pada populasi umum di atas 40 tahun dilakukan test darah tersamar pada feses (*Fecal Occult Blood Test, FOBT*), fleksibel sigmoidoskopi dan kolonoskopi.

Skrining pada kelompok masyarakat yang memiliki risiko tinggi antara lain adalah pertama, penderita yang telah menderita penyakit kolitis ulserativa atau Crohn lebih dari 10 tahun. Apabila telah berjalan selama 20 tahun atau ditemukan adanya displasia, maka kolonoskopi harus dilakukan setiap tahun. Kedua, penderita yang telah menjalani polipektomi pada adenoma kolorektal. Penderita yang telah menjalani polipektomi pada adenoma kolorektal harus selalu ditawarkan untuk menjalani *follow-up* kolonoskopi. Apabila ditemukan polip

berukuran <1 cm pada *follow-up* maka selanjutnya dilakukan kolonoskopi setiap 5 tahun. Apabila ditemukan lebih dari 3 adenoma, atau paling sedikit satu berukuran >1 cm, atau adanya displasia berat, maka dilakukan kolonoskopi setiap 3 tahun. Apabila pada kolonoskopi selanjutnya tidak ditemukan polip, maka kolonoskopi dapat dihentikan.

Ketiga, individu dengan adanya riwayat keluarga penderita CRC yang kriterianya mengikuti kriteria Amsterdam (Scottish Cancer Group, Cancer Genetics Sub-Group, 2001). Pada individu dengan tingkat resiko tinggi maka harus menjalani kolonoskopi setiap dua tahun, ditawarkan skrining tumor ginekologi, ditawarkan *upper GI* endoskopi setiap 2 tahun, dan skrining untuk kanker lainnya yang mungkin berhubungan dengan HNPCC. Usia skrining dalam rentang usia 30-70 tahun, sedangkan kanker Gaster antara usia 50-70 tahun. Pada individu dengan tingkat resiko sedang, harus menjalani kolonoskopi tunggal dan diulang jika hasil sebelumnya normal dengan skrining dilakukan pada rentang usia 30-35 tahun dan 55 tahun. Pada individu dengan tingkat resiko rendah hanya diberikan penyuluhan untuk mendorong gaya hidup sehat. Keempat, untuk individu yang memiliki risiko tinggi menderita FAP berdasarkan riwayat keluarga dengan FAP maka dilakukan pemeriksaan genetik adanya mutasi gen APC apabila fasilitas tersedia dan ditawarkan kolonoskopi setiap dua tahun dan sigmoidoskopi setiap tahun.

2.7.a. Fleksibel Sigmoidoskopi

Alat fleksibel sigmoidoskopi standar memiliki panjang 60 cm (Gambar 2.12), bentuknya mirip dengan kolonoskop namun lebih pendek. Karena ukurannya yang lebih pendek, alat ini lebih murah, mudah dalam perawatan, durabilitasnya lebih baik dari kolonoskop (Nivatvongs, 2007). Alat ini hanya mampu mencapai ujung dari *sigmoid colon* dan *descending colon* atau paling tidak hingga *splenic flexure*. Walaupun polip berukuran kecil yang ditemukan selama pemeriksaan dapat diangkat dengan alat ini, deteksi polip adenomatous atau CRC di bagian kolon lainnya dibutuhkan dengan menggunakan kolonoskop. Sebelum menggunakan alat ini, bagian bawah kolon pasien harus dibersihkan dan hal ini memberikan rasa tidak nyaman pada pasien. Pemeriksaan dengan alat ini

dapat mendeteksi tumor dengan sensitifitas dan spesifisitas tinggi (97% dan 94%) (Flamini *et al.*, 2009).



Gambar 2.12. Alat fleksibel sigmoidoskopi

(Sumber: Nivatvongs, 2007)

2.7.b. Kolonoskopi

Penggunaan kolonoskop yang berukuran 160 cm diperkenalkan pertama kali pada tahun 1970 (Nivatvongs, 2007). Alat ini mampu memperlihatkan keseluruhan kolon, dan lebih akurat dalam analisa dibandingkan dengan sigmoidoskop dengan sensitifitas untuk mendeteksi CRC lebih dari 95% dan spesifisitas mendekati 100%. Walaupun secara umum metode ini aman, namun ujung alat ini dapat melukai dinding kolon dan menyebabkan luka serius sehingga terkadang memerlukan operasi. Penggunaan alat ini membutuhkan operator yang terampil dan pembersihan kolon yang baik, sehingga adopsi metode ini untuk skrining lini pertama menjadi kendala (Flamini *et al.*, 2009).

2.7.c. Barium Enema with Air Contrast

Prosedur ini disebut juga dengan *Double Contrast Barium Enema* (DCBE), yang merupakan teknik radiologi yang dapat memvisualisasikan keseluruhan kolon setelah pemberian barium yang diikuti dengan pemberian udara pada kolon dan rectum (Flamini *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2009). Prosedur ini dapat mengidentifikasi polip berukuran besar (>1 cm) dan kanker serta lebih murah dibandingkan dengan kolonoskopi. Namun, metode ini memiliki beberapa kekurangan yaitu kurang sensitif terhadap polip yang berukuran kecil (<1 cm), pemeriksaan memakan waktu yang lebih lama, keadaan kolon yang harus bersih dari feses untuk mengurangi kesalahan interpretasi, ketidaknyamanan pasien karena harus meminum pencahar sehari sebelum pemeriksaan dan supositoria pada hari pemeriksaan (Beck, 2003; Flamini *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2009).

2.7.d. FOBT

Umumnya polip atau kanker pada kolorektal memiliki permukaan pembuluh darah yang mudah rusak oleh desakan feses yang menyebabkan keluarnya sejumlah kecil darah dalam feses. Uji FOBT telah dikembangkan untuk mendeteksi darah dalam feses melalui beberapa pendekatan. Pendekatan yang paling sering digunakan adalah pengukuran aktivitas hemoglobin peroksidase (Levin *et al.*, 2008; Flamini *et al.*, 2009; Moses, 2009). Akan tetapi, penyakit seperti *hemorrhoids*, *anal fissures*, *peptic ulcers*, *ulcerative colitis*, *gastroesophageal reflux disease*, dan *Crohn's disease* juga dapat memperlihatkan darah pada feses dan menghasilkan uji FOBT positif (palsu) (Levin *et al.*, 2008; Flamini *et al.*, 2009). Disamping itu, beberapa makanan dan obat-obatan dapat memberikan pengaruh pada uji FOBT seperti aspirin atau obat anti inflamasi non steroid (NSAIDs), asupan vitamin C yang berlebihan, daging merah, dan beberapa sayuran serta buah-buahan (Flamini *et al.*, 2009). Jika hasil tes positif, pasien harus disarankan untuk melakukan kolonoskopi. Mengulangi uji yang sama atau tindak lanjut tanpa uji kolonoskopi adalah tidak tepat. Jika hasil tes negatif, maka pasien harus memahami bahwa mereka harus mengulangi pengujian setiap tahun (Levin *et al.*, 2008).

2.7.e. *Computed Tomographic Colonography (CTC)*

Computed Tomographic Colonography (CTC) atau disebut juga sebagai koloskopi virtual, adalah pemeriksaan pencitraan dari seluruh usus besar dan rektum dengan invasif yang rendah. CTC menggunakan CT untuk mendapatkan gambar 2-dimensi (2D) dan 3-dimensi (3D) yang canggih untuk interpretasi. Prosedur CTC memberikan efisiensi waktu dengan invasi minimal, maka risiko perforasi kolon selama skrining sangat rendah. CTC tidak hanya menghasilkan gambar dari usus besar tetapi juga perut bagian atas dan bawah, sehingga dapat mengamati polip ekstrakolonik (Levin *et al.*, 2008). Disamping itu, tidak diperlukan waktu untuk sedasi atau pemulihan, juga tidak dibutuhkan pendampingan setelah dilakukannya CTC yang memungkinkan pasien dapat kembali bekerja pada hari yang sama (Levin *et al.*, 2008).

Untuk memastikan keberhasilan pemeriksaan, sangat dibutuhkan persiapan yang memadai dan distensi gas dari usus besar. Pasien biasanya menjalani persiapan yang mirip dengan pemeriksaan kolonoskopi. Keakuratan CTC dipengaruhi oleh ukuran lesi, sedangkan sensitivitas dan spesifisitas CTC bergantung pada besarnya ukuran polip. Pickhardt *et al.* (2003) menunjukkan bahwa spesifisitasnya adalah sebesar 97,4% untuk polip berukuran ≥ 1 cm tapi turun menjadi 84,5% pada polip berukuran ≥ 6 mm. Pada tiap pasien, gabungan sensitivitas dan spesifisitas CTC untuk polip besar (≥ 1 cm) masing-masing berkisar 85-93% dan 97%. Sensitivitas dan spesifisitas untuk mendeteksi polip kecil (6-9 mm) masing-masing adalah sebesar 70-86% dan 86-93%. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Halligan *et al.*, 2005 bahwa sensitivitas CTC untuk CRC sebanding dengan sensitivitas pada *optical colonoscopy (OC)* yang dilaporkan oleh Pickhardt *et al.* (2004) dan Farrar *et al.* (2006).

Namun CTC hanya sebagai sarana pengujian non-terapi dengan pencitraan saja, sehingga apabila ditemukan polip dengan ukuran yang signifikan pada pasien maka diperlukan terapi untuk *polypectomy*. Metode CTC serupa dengan endoskopi dan DCBE terkait dengan kualitas interpretasi yang sangat bergantung pada operator, sehingga sangat penting agar operator mendapatkan pelatihan dan sertifikasi.

Ada kontroversi terkait potensi bahaya selama penggunaan jangka panjang terkait dengan efek dosis radiasi dari pengujian CTC. Salah satu aspek dari kontroversi ini terkait dengan model estimasi risiko, dan berkaitan dengan risiko kanker dari paparan tunggal dan berulang dari pencitraan medis tersebut (Amis *et al.*, 2007; Brenner & Hall, 2007). Meskipun risiko ini mungkin bersifat teoritis, namun ada kekhawatiran yang berkembang bahwa orang yang banyak menjalani pemeriksaan dengan radiasi pengion selama seumur hidup maka suatu saat dosisnya dapat mencapai tingkat yang cukup tinggi.

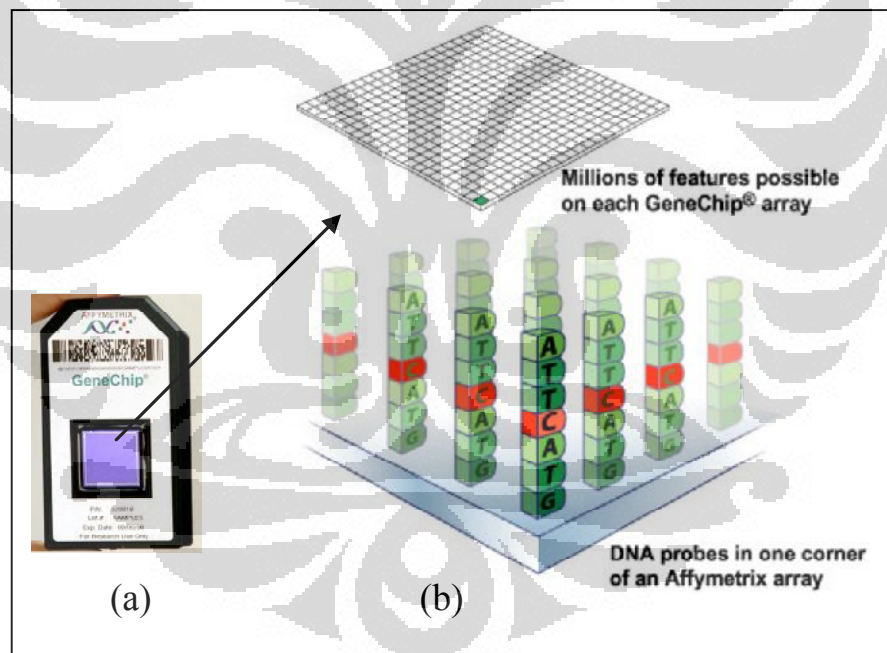
2.8. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Single Nucleotide Polymorphism adalah perubahan kecil pada genetik atau variasi yang dapat terjadi dalam sekuen DNA seseorang (NCBI, 2007a). Kode genetik ditentukan oleh empat nukleotida A (adenin), C (sitosin), T (timin), dan G (guanin). Variasi SNP terjadi bila satu nukleotida seperti A menggantikan salah satu dari tiga nukleotida lainnya seperti C, G, atau T. Sebuah contoh dari SNP adalah perubahan dari segmen DNA AAGGTTA menjadi ATGGTTA, di mana basa A dalam sekuen kedua diganti dengan T.

SNP adalah jenis yang paling umum dari variasi genetik dan dapat terjadi setiap 100 hingga 300 basa (Brooks, 2003; NCBI, 2005). Secara umum, SNP terjadi pada 1 persen populasi manusia (Brooks, 2003; NCBI, 2007a). Dari sekitar 3-5 % dari sekuen DNA individu yang dikodekan (ekson) untuk produksi protein, hanya sejumlah kecil SNP ditemukan berada dalam ekson karena sebagian besar SNP ditemukan berada di luar ekson (intron) (NCBI, 2007a). Keberadaan SNP pada daerah promotor, situs pemotongan pasca transkripsi pada *coding region* suatu gen, intron, dan *non coding region* lainnya menarik perhatian para peneliti karena SNP tersebut mungkin dapat merubah fungsi regulasi dan ekspresi suatu protein yang berasosiasi dengan suatu fenotip atau penyakit (Brooks, 2003).

2.8.1. Kegunaan SNP

Sebagian kecil SNP menjadi penanda biologis untuk penentuan suatu penyakit pada peta genom manusia karena SNP tersebut terletak pada gen yang ditemukan terkait dengan penyakit (Kang *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; Polakova *et al.*, 2009; Ivkovic *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Stanke *et al.*, 2011). SNP yang diasosiasikan dengan suatu penyakit dapat digunakan untuk mencari dan mengisolasi gen penyebab penyakit tersebut (NCBI, 2007a). Pola SNP di gen-gen target dari hasil studi perbandingan antara kelompok kasus dan kontrol pada studi asosiasi dapat digunakan untuk merancang target terapi dan desain serta respon obat pada suatu populasi (Javed & Mukesh, 2010). Studi ini didefinisikan sebagai farmakogenetik (FDA, 2008).



Gambar 2.13. *Microarray GeneChip* dari *Affymetrix Inc.*

(Sumber: (a) Göhlmann & Talloen, 2009; (b) TGen, 2004; telah diolah kembali)

Cara pendeteksian dan penemuan SNP berkembang dengan cukup pesat karena didukung oleh kemajuan teknologi sekuensing, dan setelah dipetakannya

seluruh sekuen DNA manusia pada tahun 2003 dalam *Human Genome Project*. Pemetaan seluruh sekuen manusia tersebut berdampak pula pada keberhasilan pemetaan sekuen sejumlah besar gen yang sebelumnya tidak diketahui (NCBI, 2007b). Teknologi pendeteksian SNP dalam genom manusia makin maju dengan adanya teknologi *microarray*. *Microarray* dapat digunakan untuk melihat kemiripan genotip pada kelompok orang yang terkena penyakit dan dapat menunjukkan secara akurat SNP, gen, atau kelompok gen yang berasosiasi terhadap penyakit (TGen, 2004; Göhlmann & Talloen, 2009) (Gambar 2.13). Salah satu *microarray* yaitu *GeneChip* yang diproduksi oleh *Affymetrix Inc.*, menggunakan prinsip hibridisasi untuk mengidentifikasi setiap genotip dari SNP. Dalam *chip* tersebut berisi jutaan *probe*, dimana setiap *probe* terdiri dari 25 nukleotida dan satu nukleotida diantaranya adalah posisi dari SNP yang sudah diketahui (TGen, 2004; Göhlmann & Talloen, 2009).

Sebagai contoh, kepingan (*chip*) SNP *array* 5.0 dari *Affymetrix Inc.* berisi 500K SNP dan 420K penanda *Copy Number Variations* (CNV) yang sudah diketahui (*Affymetrix Inc.*, 2012). Penanda CNV berguna untuk mengetahui apakah terdapat pola delesi atau duplikasi yang sama pada genom sampel.

2.9. Genome-Wide Association Study (GWAS)

Genome Wide Association Study (GWAS) adalah suatu pendekatan yang melibatkan seluruh set lengkap DNA/ genom dari sejumlah individu yang terkena penyakit dan tidak terkena penyakit untuk menemukan variasi genetik yang berasosiasi dengan penyakit tersebut (NHGRI, 2011). Untuk melakukan uji genetik pada penyakit yang telah diketahui gen penyebabnya, maka para ilmuwan mengumpulkan sampel darah dari sekelompok individu yang terkena penyakit dan menganalisis DNA mereka untuk melihat pola SNP. Selanjutnya, peneliti membandingkan pola-pola ini dengan pola yang diperoleh dengan menganalisis DNA dari sekelompok individu yang tidak terkena penyakit. Dengan demikian dapat ditunjukkan pola mana yang kemungkinan besar berasosiasi dengan gen penyebab penyakit. Untuk penyakit yang belum diketahui gen penyebabnya, studi

asosiasi ini dapat menentukan gen-gen kandidat dan SNP yang berasosiasi dengannya.

Dalam waktu dekat, profil SNP yang menjadi ciri khas dari berbagai penyakit dapat menjadi kenyataan. Kemudian seiring dengan waktu, dokter dapat melakukan penapisan pada tiap individu terkait dengan kerentanan terhadap penyakit hanya dengan menganalisis sampel DNA mereka untuk pola SNP tertentu (NCBI, 2007a). Aspek kunci dari GWAS adalah asosiasi SNP dengan fenotip yang diwariskan. Studi SNP dapat mempercepat identifikasi gen penyakit dengan memungkinkan para peneliti untuk mencari hubungan antara penyakit dan perbedaan SNP pada individu dalam suatu populasi.

Studi asosiasi berbeda dari pendekatan yang lebih khas seperti analisa silsilah yang melacak penularan penyakit melalui keluarga. Karena mendapatkan sampel DNA dari individu secara acak dalam suatu populasi jauh lebih mudah daripada mendapatkannya dari setiap anggota keluarga selama beberapa generasi, maka studi asosiasi dapat mempercepat penemuan gen suatu penyakit (NCBI, 2005). Setelah ditemukannya perbedaan SNP antar individu dalam suatu populasi, maka tantangan berikutnya adalah mengkorelasikan perbedaan SNP tersebut dengan fenotip seperti resiko penyakit dan respon terhadap terapi (Brooks, 2003).

GWAS yang dilakukan oleh Holst *et al.* (2010) menyimpulkan bahwa terdapat 5 lokus yang berasosiasi terhadap penurunan dan peningkatan resiko terhadap CRC. Lima lokus tersebut adalah rs16892766 pada kromosom 8q23.3, rs6983267 pada kromosom 8q24.21, rs10795668 pada kromosom 10p14, rs4779584 pada kromosom 15q13.3, dan rs4939827 pada kromosom 18q21.1. Sebelumnya, GWAS pada SNP rs6983267, rs16892766, dan rs10795668 sudah dilakukan oleh Tomlinson *et al.* (2007) dan Tomlinson *et al.* (2008), sedangkan rs4939827 berturut-turut pernah diteliti oleh Broderick *et al.* (2007) dan Tenesa *et al.* (2008), dan rs4779584 oleh Jaeger *et al.* (2008) yang kesemua hasilnya ekuivalen dengan GWAS yang dilakukan oleh Holst *et al.* (2010). GWAS tersebut dilakukan pada populasi Inggris (Tomlinson *et al.*, 2007; Tomlinson *et al.*, 2008; Tenesa *et al.*, 2008), Skotlandia, Jerman, Israel, Spanyol, Kanada, dan Jepang (Tenesa *et al.*, 2008), dan Swedia (Holst *et al.*, 2010).

Studi replikasi meta analisis yang dilakukan oleh Peter *et al.* (2012) untuk memvalidasi hasil penelitian yang dilakukan oleh para peneliti di atas, menemukan adanya 8 SNP yang memiliki asosiasi dengan kerentanan terhadap CRC. Dari lima SNP yang dilaporkan Holst *et al.* (2010) hanya empat SNP yang dapat dikonfirmasi oleh Peter *et al.* (2012), sedangkan satu SNP rs10795668 pada kromosom 10p14 tidak menunjukkan adanya asosiasi dengan kerentanan terhadap CRC. Disamping itu, GWAS yang dilakukan oleh Peter *et al.* (2012) juga melaporkan lima SNP baru yang terdapat dalam 5 region berbeda yaitu rs2373859 pada kromosom 2, rs275454 pada kromosom 5, rs2853668 pada kromosom 5, rs1525461 pada kromosom 7, rs7315438 pada kromosom 12 yang signifikan secara statistik berasosiasi dengan kerentanan terhadap CRC.

Beberapa SNP yang sering ditemukan pada 11 lokus gen di kromosom 8q23.3, 8q24.21, 9p24, 10p14, 11q23.1, 14q22.2, 15q13.3, 16q22.1, 18q21.1, 19q13.1, dan 20p12.3 telah diidentifikasi memiliki asosiasi terhadap peningkatan dan penurunan resiko CRC (Broderick *et al.*, 2007; Haiman *et al.*, 2007; Tomlinson *et al.*, 2007; Zanke *et al.*, 2007; Easton dan Eeles, 2008; Houlston *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2008; Tenesa *et al.*, 2008 Tomlinson *et al.*, 2008; Le Marchand, 2009). Semua lokus di atas secara eksklusif banyak diteliti pada populasi Eropa, dan efek resiko alel dari lokus tersebut sejauh ini belum banyak diketahui pada populasi lainnya (Ho *et al.*, 2011). Pada tahun 2012, Cicek *et al.* melaporkan lokus baru di kromosom 4q21.1 (rs10518142), 8q13.2 (rs1319036), 12q24.32 (rs952093), dan 15q22.31 (rs1477798) yang memiliki kerentanan terhadap CRC pada populasi keluarga di Australia, Kanada, dan Amerika.

Studi replikasi yang dilakukan pada populasi etnis Han Cina di Hongkong oleh Ho *et al.* (2011) menemukan 12 SNP yang secara signifikan berasosiasi terhadap CRC. SNP tersebut terletak pada kromosom 8, 10, 14, 15, dan 18. SNP tersebut antara lain adalah rs7014346 (8q24.21), rs10795668 (10p14), rs706771 (10p14), rs827401 (10p14), rs7894531 (10p14), rs7898455 (10p14), rs4474353 (10p14), rs16970016 (15q14), rs1554865 (15q14), rs4779584 (15q14), rs4939827 (18q21.2), dan rs12953717 (18q21.2). Hanya 5 dari 12 SNP tersebut yang juga terdapat pada populasi Han Cina di Hongkong yaitu rs7014346 (8q24.21),

rs10795668 (10p14), rs4779584 (15q14), rs12953717 (18q21.2), dan rs4939827 (18q21.2).

Umumnya penelitian di atas dilakukan pada CRC yang diwariskan atau memiliki keluarga yang menderita CRC. Bodmer (2006) dan Migliore *et al.* (2011) mengatakan bahwa porsi CRC sporadik berkisar antara 70-75%, sedangkan CRC yang diwariskan hanya sebesar 25%. Untuk itu perlu diteliti lebih lanjut untuk mengetahui pola kerentanan genetik yang berasosiasi dengan perkembangan kanker pada CRC sporadik terutama pada populasi orang di Indonesia. Dengan mengetahui pola kerentanan tersebut diharapkan akan memberikan informasi terkait etiologi penyakit yang diasosiasikan dengan variasi genetik, memberikan informasi data variasi genetik yang berasosiasi dengan CRC sporadik pada suatu populasi yang nantinya dapat dikembangkan menjadi penanda pada CRC sporadik, dan memberikan informasi yang berguna untuk keperluan skrining lini pertama penyakit CRC di laboratorium klinik atau rumah sakit kanker.

Penelitian pendahuluan untuk mendefinisikan variasi genetik yang terkait dengan kerentanan terhadap CRC pada populasi yang ada di Makassar-Sulawesi Selatan menggunakan SNP *array* telah dilakukan pada tahun 2009 di Mochtar Riady Institute for Nanotechnology (MRIN) yang dianalisa oleh Capital Bio (Beijing). Selain untuk menemukan kandidat SNP yang terkait dengan resiko CRC sporadik, penelitian pendahuluan tersebut juga bertujuan untuk mengidentifikasi *Copy-Number Variable* (CNV) pada suatu lokus yang berasosiasi dengan CRC, karena *platform* yang digunakan adalah kepingan *Affymetrix 5.0* yang berisi 500.000 SNP dan 420.000 CNV yang sudah diidentifikasi. Dari hasil penelitian tersebut, diperoleh beberapa SNP dan CNV yang memiliki asosiasi dengan kerentanan terhadap CRC sporadik (MRIN, 2009) (data tidak dipublikasi).

Pada penelitian ini, dilakukan validasi pada salah satu SNP yang ditemukan dari hasil penelitian pendahuluan tersebut yaitu SNP "X". Dari penelitian tersebut diketahui bahwa SNP "X" terletak di kromosom 15. Alel dari SNP tersebut adalah G/T. SNP "X" berada sekitar 2,5 kilo pasang basa (kpb) dari ujung 5' gen *ACTC1* (*Actin, Alpha Cardiac Muscle 1 Proprotein*) yang memiliki

fungsi dalam regulasi kontraksi otot (jantung) dan ekspresi protein komponen pembentuk sitoskeleton (*Weizmann Institute of Science*, 2012). SNP “X” memiliki jarak sekitar 31 kpb dari ujung 5’ gen *GJD2* (*Gap Junction Delta 2*) yang berfungsi dalam komunikasi antar sel (NCBI, 2012).



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2011 sampai dengan Juli 2012 di Laboratorium *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Mochtar Riady Institute for Nanotechnology* (MRIN), Lippo Karawaci-Tangerang, Banten dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi-Universitas Indonesia. Jadwal kerja dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.2. Pra Penelitian

Sebelum melakukan semua tahapan kerja, terlebih dahulu dilakukan pra penelitian. Pra penelitian yang dilakukan meliputi perancangan primer dan penyiapan bahan penelitian, dan optimasi suhu penempelan primer (*annealing step*) proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pada Lampiran 4 ditunjukkan sekuen DNA SNP "X" yang terdapat pada kromosom 15. Dari 2047 pasang basa (pb), sekuen DNA pada bagian atas dan bawah yang ditulis dengan huruf kecil yang digarisbawahi merupakan primer *Forward* (F) (hijau tua) dan *Reverse* (R) (hijau muda). Ukuran produk PCR adalah 979 pb. Sekuen DNA dengan huruf kecil (merah) yang diapit oleh sekuen DNA huruf kapital yang digarisbawahi merupakan posisi SNP "X".

Sebelum dilakukan amplifikasi DNA, pada kedua primer dilakukan optimasi suhu penempelan primer (*annealing step*) pada rentang suhu 55-67°C menggunakan pengaturan *gradient calculator* pada alat *Peltier Thermal Cycler* (PTC), *DNA Engine* (BIO-RAD). Dari 12 titik suhu, dipilih 8 titik suhu untuk proses optimasi *annealing step* yaitu 55,0; 56,1; 58,4; 60,2; 62,2; 65,2; 66,1; dan 67,0°C. Tahap-tahap dalam reaksi PCR mengacu pada Suriapranata *et al.* (2011) dengan modifikasi pada tahap *annealing step* pada rentang 8 suhu optimasi yang sudah dipilih di atas. Setelah didapatkan suhu optimal dari proses optimasi PCR, maka suhu tersebut akan digunakan dalam proses PCR selanjutnya.

3.3. Sampel

Sampel darah yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari stok beku -80°C . Sampel darah didapatkan dari pasien CRC dan kontrol sehat yang dikumpulkan oleh Tim Dokter Rumah Sakit yang ada di Makassar, Sulawesi Selatan yang antara lain adalah RS. Wahidin, RS. Ibnu Sina, RS. Grestelina, RS. Islam Faisal, dan RS. Bhayangkara yang memiliki kerjasama penelitian dengan MRIN. Disamping itu, Tim Dokter juga melakukan perekrutan relawan dan mendiagnosis penyakit dengan mengisi kartu insiden (Lampiran 5). Sampel darah pasien CRC diambil saat akan melakukan pembedahan selama kurun waktu Juni 2006 sampai dengan Juni 2010.

Kriteria inklusi untuk pasien CRC adalah pasien yang terdiagnosis CRC melalui biopsi, pasien CRC yang sebelumnya tidak menderita kanker lain, pasien CRC yang tidak memiliki riwayat keluarga derajat pertama seperti ayah, ibu, anak, kakak, dan adik yang menderita CRC dan kanker lain. Kriteria eksklusi adalah pasien yang tidak terdiagnosis CRC, pasien CRC yang sebelumnya menderita kanker lain, dan pasien CRC yang memiliki riwayat keluarga derajat pertama seperti ayah, ibu, anak, kakak, dan adik yang menderita CRC dan kanker lain, serta pasien CRC yang memiliki data usia, jenis kelamin, riwayat kanker, dan tipe kanker yang tidak lengkap.

Kriteria inklusi pada kontrol sehat adalah mereka yang tidak memiliki riwayat keluarga derajat pertama seperti ayah, ibu, anak, kakak, dan adik yang menderita CRC dan kanker lain. Kriteria eksklusi pada kontrol sehat adalah mereka yang memiliki riwayat keluarga yang terkena kanker, dan memiliki data usia, jenis kelamin, riwayat kanker, dan tipe kanker yang tidak lengkap.

Pasien CRC maupun kontrol yang diikutkan dalam penelitian ini telah memberikan persetujuan dan menandatangani formulir *informed consent* setelah diberikan penjelasan oleh dokter/ perawat. Penelitian ini juga telah disetujui oleh Dewan Komisi Etik MRIN.

3.4. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah *Thermo-Block* NB-305TB (N-BIOTEK Inc.), *NanoDrop spectrophotometer* ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*), *Peltier Thermal Cycler* (PTC), *DNA Engine* (BIO-RAD), *Biological Safety Cabinet* (NUAIRE), *Allegra X-15R Centrifuge* (BECKMAN COULTER), *PowerPac Basic* (BIO-RAD), *VersaDoc Imaging System* (BIO-RAD), *ABgene ALPS-300* (Applied Biosystems), Pompa vakum, *Multi Screen PCR₉₆ Filter Plate* (Millipore, Billerica), *ABI 3130xl Genetic Analyzer*, *Pipettor* 1000, 200, 20, dan 10 µl, *Multi channel pipettor* 300, 50 dan 10 µl, *Unimax 2010 Orbital Shaker* (HEIDOLPH), *Centrifuge 5415R* (EPPENDORF).

Bahan yang digunakan antara lain adalah air destilat, *Qiamp DNA minikit* (QIAGEN Inc.), *10X PCR Buffer II* (Applied Biosystems), *GeneAmp[®]* (dNTP mix with dTTP) (Applied Biosystems), *MgCl₂* (Applied Biosystems), primer R (5'-GGTTGAGGCTGGAAGTGAAG-3'), *Ampli Taq Gold[®]* 250U, 5U/ µL (Applied Biosystems), primer F (5'-CACAGTCTGCTCTTTGAAGG-3'), *Tris* (BIO-RAD), *EDTA* (BIO-RAD), *Asam asetat glacial*, pro analisis (Merck), *UltraPure[™]* *Agarose* (Invitrogen), *100 bp DNA Ladder* (New England BioLabs), *1.5 mL Gel Loading Dye, Blue (6X)* (New England BioLabs), Enzim eksonuklease (*ExoI*) (Takara), *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) Tested User Friendly[™]* (USB Corp.) 5000U, 1U/ µL, *SAP Buffer* (USB Corp.), *5X Sequencing Buffer for Big-Dye terminator v3.1* (Applied Biosystems), *Big-Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystems), *Hi-Di[™]* *Formamide* (Applied Biosystems), *POP-7[™]* *Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers* (Applied Biosystems).

3.5. Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan studi potong lintang (*Cross Sectional*), karena data rekam medik dan sampel darah diambil pada satu waktu. Penentuan besarnya jumlah sampel dan kekuatan (*power*) pada kelompok CRC dan kontrol ditentukan dengan menggunakan *software* Epi Info versi 3.5.1 (CDC, 2011).

3.6. Tahapan Kerja

3.6.1. Isolasi DNA

DNA diisolasi dari sampel darah dengan Protokol Putar (*Spin Protocol*) menggunakan QIAamp DNA *blood mini kit* (Qiagen Inc). Persiapan yang perlu dilakukan sebelum isolasi DNA adalah pencairan sampel darah dari ruang penyimpanan beku -80°C ke suhu ruang ($15-25^{\circ}\text{C}$), blok inkubator diatur pada suhu 56°C , buffer AE atau air destilat disiapkan pada suhu ruang untuk elusi, buffer AW1, buffer AW2, dan Protease QIAGEN disiapkan seperti pada tabel di bawah ini.

Tabel 3.1. Preparasi pada Buffer AW1 dan AW2

Buffer	Ukuran kit	Konsentrasi (ml)	Etanol 96% (ml)	Volume akhir (ml)	Penyimpanan
AW1	50	19	25	44	Simpan dalam suhu ruang, tutup vial dengan aluminium foil
	250	95	125	220	
AW2	50	13	30	43	
	250	66	160	226	

Tabel 3.2. Preparasi pada pelarut protease

Ukuran Kit	Pelarut protease (ml)	Penyimpanan
50	1,2	2-8 °C untuk jangka waktu 2 bulan, -20 °C untuk penyimpanan jangka panjang
250	5,5	

Buffer AL dilarutkan dengan menginkubasi pada suhu 56°C , semua proses sentrifugasi harus dijalankan pada suhu ruang. Sebanyak $1\ \mu\text{l}$ larutan yang mengandung $5-10\ \mu\text{g}$ pembawa DNA ditambahkan ke dalam $200\ \mu\text{l}$ buffer AL jika sampel mengandung $<10,000$ genom.

Tahapan isolasi DNA dari darah mengikuti instruksi dari produsen (QIAGEN Inc.) yang kesemuanya tercantum dalam Lampiran 6. Dari $200\ \mu\text{l}$ sampel darah yang digunakan untuk mengisolasi DNA, umumnya akan

menghasilkan DNA genom sebanyak 6 µg dalam 200 µl air (buffer AE) (30 ng/µl) dengan rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,7-1,9. Konsentrasi DNA genom diukur menggunakan NanoDrop *spectrophotometer* ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*) dan disesuaikan pada kisaran minimum di atas 10 ng/µl (Suriapranata *et al.*, 2011) untuk penggunaan lebih lanjut.

3.6.2. Polymer Chain Reaction (PCR)

PCR bertujuan untuk mengamplifikasi fragmen DNA yang kita inginkan dari keseluruhan DNA yang telah diisolasi. Reagen dan volume yang dibutuhkan untuk proses ini antara lain:

Tabel 3.3. Komposisi reagen pada proses PCR

Reagen	Konsentrasi dalam 1X reaksi	Volume dalam 1X reaksi (µl)
10X dapar PCR	1X	2,50
2,5 mM dNTP's	0,20 mM	2,00
2,5 mM MgCl ₂	0,15 mM	1,50
10 µM primer Kiri (<i>Forward</i>)	0,3 µM	0,75
10 µM primer Kanan (<i>Reverse</i>)	0,3 µM	0,75
Gold Taq 5U/µl	0,026 U/µl	0,13
Cetakan DNA (<i>template</i>)	~ 0.8 µM	2,00
dH ₂ O		15,37
Volume total		25,00

Reaksi PCR dengan volume total 25 µl dilakukan sebanyak 40 siklus (*cycle*) menggunakan *Peltier Thermal Cycler* (PTC), *DNA Engine* (BIO-RAD). Tahap-tahap dalam reaksi PCR mengacu pada Suriapranata *et al.* (2011) dengan menggunakan suhu *annealing step* hasil optimasi.

3.6.3. Gel Electrophoresis

Reaksi PCR dilanjutkan dengan elektroforesis gel untuk mengkonfirmasi tingkat keberhasilan PCR dengan membandingkan pita serapan UV hasil PCR dengan pita DNA pembanding. Ukuran panjang DNA hasil PCR sekitar 1 kpb (kilo pasang-basa), dari panjang aktual sebesar 979 pb. Elektroforesis gel dilakukan pada agarosa 2% dengan potensial sebesar 100 Volt, arus 400 mA selama 35 menit menggunakan instrument *PowerPac Basic* (BIO-RAD). Hasil elektroforesis gel didokumentasikan dengan menggunakan *VersaDoc[®] Imaging System* (BIO-RAD).

3.6.4. Purifikasi DNA

DNA yang telah berhasil di PCR dan dikonfirmasi dengan elektroforesis gel kemudian dipurifikasi untuk menghilangkan sisa garam dan komponen lain yang dapat mengganggu proses sekuensing. Proses purifikasi dilakukan dengan menggunakan *Multi Screen PCR₉₆ Filter Plate* (Millipore, Billerica). Tahapan purifikasi dengan metode ini dapat dilihat pada Lampiran 7.

Pada proses ini DNA untai ganda hasil PCR dengan ukuran >100pb akan tertahan dalam membran berpori, sedangkan primer dan komponen sisa proses PCR akan tercuci dan terbuang saat proses vakum dilakukan. DNA untai ganda yang berada dalam membran dapat dipipet kembali ke plate reaksi yang baru. Tahapan purifikasi DNA juga dilakukan dengan metode PCR *Digestion* menggunakan enzim *exonuclease 1 (ExoI)* dan *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* (Suriapranata *et al.*, 2011). Enzim *ExoI* akan mendegradasi sisa primer, sedangkan SAP mendegradasi sisa dNTP yang terdapat pada produk PCR.

Proses PCR *Digestion* dilakukan menggunakan *Peltier Thermal Cycler, DNA Engine* (BIO-RAD) dengan 3 tahapan penting yang antara lain adalah pertama pada suhu 37 °C selama 75 menit; 85 °C selama 15 menit, dan 4 °C untuk penyimpanan sementara atau pada suhu -20 °C untuk penyimpanan jangka panjang. Reagen-reagen yang dibutuhkan dalam proses PCR *Digestion* adalah:

Tabel 3.4. Komposisi reagen pada PCR *digestion*

Reagen	Konsentrasi dalam 1X reaksi	Volume dalam 1X reaksi (μl)
dH ₂ O		4,60
10X dapar SAP	1X	1,20
SAP + Exo1 1 U/ μl	0,17 U/μl	0,20
Cetakan DNA (produk PCR)		6,00
Volume total		12,00

3.6.5. *Cycle Sequencing* dan Presipitasi EDTA/ Etanol

Sebelum masuk ke proses sequencing, DNA diamplifikasi kembali menggunakan *Peltier Thermal Cycler, DNA Engine* (BIORAD) sebanyak 25 kali siklus. Pada akhir *cycle sequencing* akan dihasilkan fragmen-fragmen DNA dengan panjang bervariasi. Proses *cycle sequencing* dilakukan dengan tahapan inisiasi pada suhu 96 °C selama 1 menit, tahap denaturasi pada suhu 96 °C selama 10 detik, tahap penempelan primer pada suhu 50 °C selama 5 detik, tahap pemanjangan (elongasi) pada suhu 60 °C selama 4 menit, dan tahap penyimpanan pada suhu 4 °C (-20 °C untuk jangka panjang). Reagen-reagen yang dibutuhkan dalam proses *cycle sequencing* adalah:

Tabel 3.5. Komposisi reagen pada proses *cycle sequencing*

Reagen	Konsentrasi dalam 1X reaksi	Volume dalam 1X reaksi (μl)
dH ₂ O		2,75
5X <i>Sequencing Buffer for Big-Dye terminator v3.1</i>		2,80
<i>Big-Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit</i>		0,45
3.3 μM primer Kiri (F) atau Kanan (R)	0,33 μM	1,50
Cetakan DNA (produk PCR)		7,50
Volume total		15,00

Setelah proses *cycle sequencing* selesai, dilanjutkan dengan presipitasi EDTA/ etanol. Langkah-langkah pada proses ini dapat dilihat pada Lampiran 8.

3.6.6. Sequencing

Proses sekuensing dilakukan dengan cara memisahkan fragmen-fragmen DNA menggunakan sekunser 16 kapiler dari ABI 3130xl *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, California*). Elektroforesis gel dengan resolusi tinggi pada proses sekensing dapat memisahkan fragmen yang panjangnya hanya berbeda satu nukleotida (Karp, 2010). Perangkat lunak pengumpul data pada sekunser mengubah sinyal fluoresensi menjadi data digital, kemudian mencatat data dalam bentuk berkas *.ab1 (*Life Technologies, 2012*).

3.7. Rencana Analisis

Data hasil sekuensing akan disejajarkan (*aligned*) dan dianalisa menggunakan *software* Bioedit (versi 7.0.5) dan *Chromas* (versi 2.01). Hasil sekuensing dibandingkan dengan sekuen *fasta format* dari *wild type* SNP "X" yang ada di *genebank* (NCBI, 2012). Karena penelitian ini adalah analisa komparatif numerik tidak berpasangan dan lebih dari dua kelompok maka uji statistik yang digunakan adalah *two by two table*.

Uji homogenitas sebaran usia pada kedua kelompok menggunakan *T-Test*, sedangkan sebaran jenis kelamin menggunakan *Mann-Whitney Test*. Untuk mengetahui apakah distribusi genotip pada SNP tersebut masih dalam HWE (*Hardy-Weinberg Equilibrium*) dan tidak terdapat bias pada model genotip dominan/resesif secara biologis (alami) atau kesalahan teknis (*sequencing*) dilakukan perhitungan nilai *P-Value* dari HWE (Rodriguez, Gaunt, dan Day, 2009). Setelah didapatkan nilai kesetimbangan *Hardy-Weinberg*, maka dilanjutkan dengan analisa *two by two table* yang menghitung nilai *P-Value* dari perhitungan *Pearson Chi-Square* sebesar $\leq 0,05$ untuk signifikansi secara statistik dan perhitungan nilai *Odds Ratio* (OR) dengan interval kepercayaan 95% (CI 95%) pada untuk melihat apakah alel pada SNP "X" memiliki asosiasi dengan kerentanan terhadap CRC sporadik.

Perhitungan nilai HWE dilakukan dengan menggunakan tautan situs yang disitasi oleh Rodriguez, Gaunt, dan Day (2009) dan dikonfirmasi dengan program perhitungan di Microsoft Excel 2003. Perhitungan *T-Test*, *Mann-Whitney Test*,

nilai *P-Value* dari *Pearson Chi-Square* dan *OR* dilakukan dengan menggunakan program PASW versi 18 dan dikonfirmasi dengan program Open Epi versi 2.3 (Dean, Sullivan, dan Soe, 2011) dan Epi Info versi 7 (CDC, 2012). Contoh tabulasi dan perhitungan uji-uji di atas dapat dilihat pada Lampiran 9.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Desain Primer dan Optimasi PCR

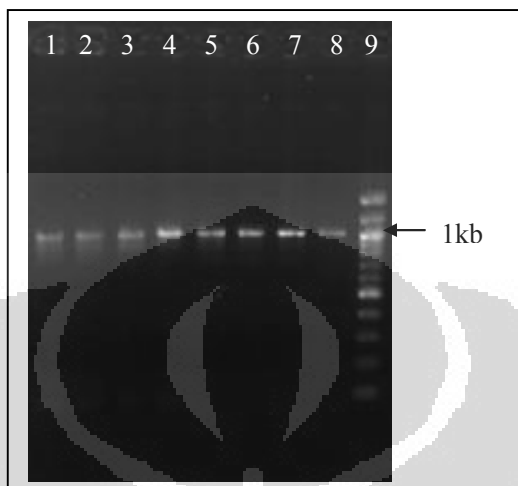
Pada Lampiran 9 ditunjukkan empat pasang primer yang didesain untuk amplifikasi dari SNP “X” yang berada di kromosom 15 dengan perbandingan nilai energi bebasnya (ΔG). Nilai ΔG sangat menentukan kualitas primer yang didesain. Semakin negatif nilai ΔG maka semakin mudah membentuk struktur homodimer, heterodimer dan hairpin sehingga semakin jelek pula kualitas primer tersebut. Analisa nilai ΔG dari ketiga struktur tersebut dilakukan pada situs *Integrated DNA Technologies, Inc* (IDT) (IDT, 2011b).

Berdasarkan analisa keempat primer, primer nomor 1 dipilih sebagai primer yang digunakan dalam PCR karena nilai ΔG pada struktur *hairpin*, *homodimer*, dan *heterodimer* secara keseluruhan lebih positif dibandingkan dengan ketiga primer lainnya.

Primer nomor 1 memiliki detail spesifikasi seperti yang ditunjukkan pada lampiran 10. Primer 1 F (5'-CACAGTCTGCTCTTTGAAG G-3') dan R (5'-GGTTGAGGCTGGAAGTGAA G-3') masing-masing memiliki panjang 20 pb, dengan titik leleh; kandungan guanin dan sitosin; bobot molekul; berturut-turut sebesar 60,4 dan 62,4 °C; 50 dan 55; dan 6108 dan 6302 Dalton. Untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 100 μM pada primer F dan R masing-masing ditambahkan dapar TE sebanyak 345 dan 302 μl dan dibagi rata ke dalam 5 tabung 1,5 ml baru dan disimpan dalam suhu -20°C (Lampiran 11).

Hasil optimasi *annealing step* di 8 titik suhu untuk proses PCR yaitu 55,0; 56,1; 58,4; 60,2; 62,2; 65,2; 66,1, dan 67,0°C didapatkan hasil seperti yang terlihat pada Gambar 4.1. Delapan optimasi yang terlihat pada gel elektroforesis, suhu 58,4; 60,2; 62,2 dan 67,0°C memberikan hasil PCR yang lebih baik dibanding suhu pada nomor 1, 2, 3, dan 8 karena *band* yang dihasilkan lebih jelas. Namun, suhu 62,2 °C dipilih sebagai suhu yang akan digunakan dalam proses PCR selanjutnya. Hal ini didasarkan karena suhu tersebut masih dalam rentang titik leleh yaitu 55-72°C dan suhunya lebih tinggi dibandingkan dua suhu lainnya yang

dapat menghasilkan produk dan spesifisitas yang lebih baik (Weissensteiner, Griffin, dan Griffin, 2004) (Gambar 4.1).



Ket: (1) suhu 55,0 °C; (2) suhu 56,1 °C; (3) suhu 58,4 °C; (4) suhu 60,2 °C; (5) suhu 62,2 °C; (6) suhu 65,2 °C; (7) suhu 66,1 °C; (8) suhu 67,0 °C; (9) *ladder (marker)*

Gambar 4.1. Gel elektroforesis hasil optimasi *annealing step* pada proses PCR

4.2. Sampel

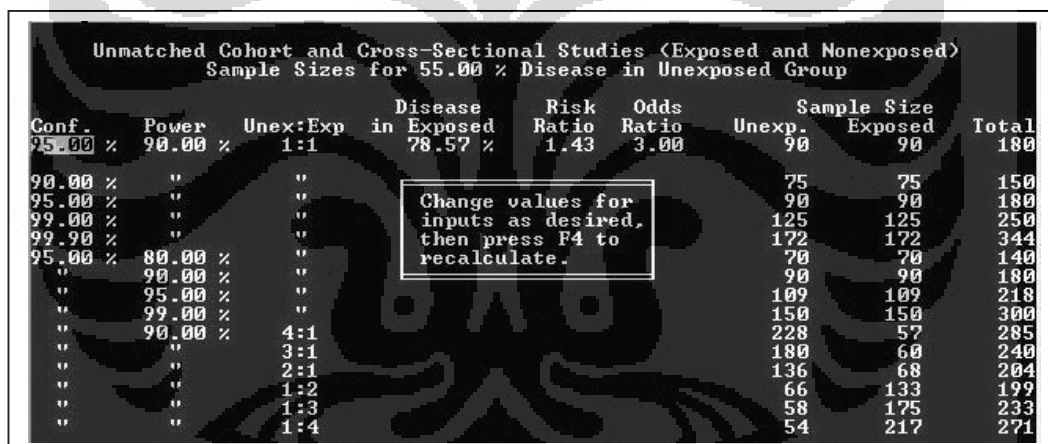
Jumlah sampel darah kontrol yang ada di stok beku adalah 119 buah, sedangkan sampel darah CRC adalah sebanyak 359 buah. Namun dari hasil inklusi dan eksklusi data rekam medik, didapatkan 109 orang untuk kelompok kontrol dari total 119 orang. Pada kelompok CRC didapatkan 174 orang dari 359 orang, dengan mengeksklusi sebanyak 185 orang. Keseluruhan alur proses pemilihan sampel pada kelompok kontrol dan kelompok CRC dapat dilihat pada Lampiran 12.

4.3. Desain Penelitian

Dengan memasukkan *confidence level* sebesar 95%, *power* sebesar 90%, persentase SNP yang terekspos pada pasien sehat (kontrol) sebanyak 55% yang

didapatkan dari data penelitian SNP “X” pada populasi Jepang dan Cina di *genebank* dan nilai *Odds Ratio* sebesar 3 maka didapatkan perbandingan jumlah sampel kasus dan kontrol seperti yang terdapat pada Gambar 4.2.

Dari Gambar 4.2 didapatkan 15 kombinasi jumlah kontrol (*unexposed*) dan CRC (*exposed*) yang dapat digunakan dalam penelitian. Namun kombinasi jumlah sampel yang dipilih adalah 1:1 untuk kontrol: CRC yaitu 109:109. Hal ini dikarenakan nilai *confidence level* dan *power* berada pada nilai 95% yang memberikan hasil penelitian yang valid dari perbandingan jumlah sampel tersebut, karena semakin besar nilai *power* maka semakin kecil kesalahan tipe 2 (nilai β) atau positif palsu dan semakin kecil pula kesalahan tipe 1 (negatif palsu) (Bolton S & Bon C, 2010).



Unmatched Cohort and Cross-Sectional Studies (Exposed and Nonexposed)									
Sample Sizes for 55.00 % Disease in Unexposed Group									
Conf.	Power	Unex:Exp	Disease in Exposed	Risk Ratio	Odds Ratio	Sample Size		Total	
						Unexp.	Exposed		
95.00 %	90.00 %	1:1	78.57 %	1.43	3.00	90	90	180	
90.00 %	"	"	"	"	"	75	75	150	
95.00 %	"	"	"	"	"	90	90	180	
99.00 %	"	"	"	"	"	125	125	250	
99.90 %	"	"	"	"	"	172	172	344	
95.00 %	80.00 %	"	"	"	"	70	70	140	
"	90.00 %	"	"	"	"	90	90	180	
"	95.00 %	"	"	"	"	109	109	218	
"	99.00 %	"	"	"	"	150	150	300	
"	90.00 %	4:1	"	"	"	228	57	285	
"	"	3:1	"	"	"	180	60	240	
"	"	2:1	"	"	"	136	68	204	
"	"	1:2	"	"	"	66	133	199	
"	"	1:3	"	"	"	58	175	233	
"	"	1:4	"	"	"	54	217	271	

Gambar 4.2. Pengukuran besaran sampel yang akan digunakan dalam penelitian

Berdasarkan nilai *confidence level* dan *power* di atas, maka jumlah sampel untuk kelompok kontrol sudah sesuai yaitu 109 orang. Pada kelompok CRC, untuk mengikutkan 109 orang dari 174 orang yang sudah terinklusi maka dilakukan *proportional stratified random sampling*. Cara ini memungkinkan untuk mendapatkan hasil yang presisi dalam pengambilan data (Hunt & Tyrrell, 2004; Bolton & Bon, 2010). Sampel sebanyak 174 orang tersebut di stratifikasi berdasarkan usia yaitu rentang usia 30-40 tahun sebanyak 26 orang, rentang usia

41-50 sebanyak 40 orang, rentang usia 51-60 sebanyak 48 orang, rentang usia 61-70 sebanyak 46 orang, rentang usia 71-80 sebanyak 14 orang (Lampiran 12).

Dari masing-masing strata usia, dipilih sejumlah sampel secara proporsional dengan pengambilan secara acak. Proporsi ini diperoleh dengan rumus (Hunt dan Tyrell, 2004):

$$X = \left(\frac{a}{n} \right) \times N \quad (4.1)$$

Ket:

a= jumlah sampel pada setiap strata usia

n= jumlah total keseluruhan sampel hasil inklusi

N= jumlah total sampel yang akan diikuti dalam penelitian

Dari persamaan di atas didapatkan masing-masing jumlah sampel tiap strata yang dapat diikuti dalam penelitian yaitu 16 orang pada rentang usia 30-40 tahun, 25 orang pada rentang usia 41-50, 30 orang pada rentang usia 51-60, 29 orang pada rentang usia 61-70, dan 9 orang pada rentang usia 71-80 (Lampiran 12). Hasil kalkulasi perhitungan rumus di atas (4.1) pada masing-masing strata dapat dilihat pada Lampiran 13.

Dari teknik *proportional stratified random sampling* untuk kelompok CRC didapatkan rentang usia pada laki-laki adalah 30-75 tahun dengan rerata usia $53,93 \pm 12,94$ tahun dan pada perempuan adalah 32-77 tahun dengan rerata usia $54,04 \pm 10,52$ tahun. Rentang usia pada kelompok Kontrol adalah 19-70 tahun dengan rerata usia $45,70 \pm 10,69$ tahun pada laki-laki dan 19-68 tahun dengan rerata usia $43,85 \pm 13,30$ tahun pada perempuan. Rerata usia di kedua jenis kelamin pada kelompok CRC sebesar $53,98 \pm 11,88$ tahun, dan pada kelompok Kontrol adalah $44,65 \pm 12,23$ tahun. Berdasarkan perhitungan *T-Test (two-tailed, 99% CI)*, didapatkan perbedaan yang sangat signifikan secara statistik antara kelompok Kontrol dengan CRC yaitu dengan nilai *P-Value* sebesar $1,0 \times 10^{-7}$ (Tabel 4.1) Perbedaan ini akan mempengaruhi hasil perhitungan nilai *P-Value* dan *Odds Ratio* pada genotip, sehingga perlu dilakukan penyesuaian (*adjusted*) dengan

menghilangkan faktor usia dalam perhitungan tersebut dengan menggunakan perhitungan *binary logistic regression*.

Tabel 4.1. Karakteristik sampel pada kelompok CRC dan Kontrol

Karakteristik	Kelompok CRC	Kelompok Kontrol
Jumlah	109	109
Usia (tahun)		
Laki-laki (rentang; simpangan baku)	53,93 (30-75; 12,94)	45,70 (19-70; 10,69)
Perempuan (rentang; simpangan baku)	54,04 (32-77; 10,52)	43,85 (19-68; 13,30)
Rata-rata keduanya (rentang; simpangan baku)	53,98 (30-77; 11,88)	44,65 (19-70; 12,23)
<i>P-Value (T-Test, two-tailed, 99% CI)</i>	1,0 x 10 ⁻⁷	
Jenis Kelamin (%)		
Laki-laki	60 (55,05)	47 (43,12)
Perempuan	49 (44,95)	62 (56,88)
<i>P-Value (Non Parametric Test, Mann-Whitney Test)</i>	0,079	
Lokasi Tumor (%)		
Kolon	-	-
Rektum	5 (4,59)	-
Kolorektal	104 (95,41)	-
Histopatologi (%)		
<i>Adenocarcinoma</i>	3 (2,75)	-
<i>Moderately differentiated adenocarcinoma</i>	59 (54,13)	-
<i>Poorly differentiated adenocarcinoma</i>	18 (16,51)	-
<i>Well differentiated adenocarcinoma</i>	29 (26,61)	-

Pada kelompok CRC, 49 orang berjenis kelamin perempuan dan 60 orang berjenis kelamin laki-laki. Pada kelompok kontrol didapatkan 62 orang berjenis kelamin perempuan dan 47 orang berjenis kelamin laki-laki. Hasil penghitungan statistik untuk jenis kelamin pada kedua kelompok menggunakan *Non Parametric Test (Mann-Whitney Test)* tidak didapatkan perbedaan secara signifikan, karena nilai *P-Value* sebesar 0,079 (*P-Value* >0,05). Distribusi jenis kelamin, usia dan hasil penghitungan statistik dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tumor yang berada di kedua bagian yaitu kolon dan rektum pada kelompok CRC sebanyak 104 (95,41%) orang, dan sisanya terdapat di rektum saja yang berjumlah 5 (4,59%). Distribusi histopatologi pada kelompok CRC dari 109 sampel berturut-turut adalah sebanyak 59 (54,13%), 29 (26,61%), 18 (16,51%), dan 3 (2,75%) orang untuk pasien dengan *Moderately differentiated adenocarcinoma*, *Well differentiated adenocarcinoma*, *Poorly differentiated adenocarcinoma*, dan *Adenocarcinoma*.

4.4. PCR, Gel Electrophoresis, dan Analisis Statistik

Hasil PCR yang divisualisasi melalui elektroforesis gel menggunakan suhu *annealing* hasil optimasi yaitu sebesar 62,2°C. Suhu tersebut memberikan hasil yang baik pada proses PCR yang ditunjukkan dengan *band* yang tebal di elektroforesis gel (Lampiran 14). Tiga tipe genotip hasil sekuensing pada SNP “X” dapat dilihat pada Lampiran 15. Perhitungan nilai HWE pada ketiga genotip di kedua kelompok menunjukkan bahwa distribusi genotip masih berada dalam HWE, karena nilai *P-Value* >0,05 (Tabel 4.2). Hasil perhitungan ini menunjukkan tidak adanya bias pada sebaran genotip di kelompok Kontrol dan CRC.

Tabel 4.2. Nilai *P-Value* pada HWE

Kelompok	Genotip	Jumlah	Total	MAF	HWE		<i>P-Value</i> HWE
					<i>Observed</i>	<i>Expected</i>	
CRC	TT	11	109	T 0,303	11	9.991	0.647
	GT	44			44	46.018	
	GG	54			G 0,697	54	
Kontrol	TT	23	109	T 0,417	23	18.993	0.115
	GT	45			45	53.014	
	GG	41			G 0,583	41	

Keterangan: Nilai χ^2 pada interval kepercayaan 95%

Jika dalam perhitungan HWE di masing-masing kelompok dihasilkan nilai *P-Value* < 0.05 berarti terdapat bias pada sebaran genotip, maka harus ada

perhitungan lanjutan untuk mengkoreksi bias tersebut. Perhitungan tersebut adalah *Armitage's trend test*, yang diperkenalkan oleh Sasieni (1997), dan digunakan oleh Holst *et al.* (2010) dalam penelitiannya untuk mengkoreksi bias sebaran genotip. Perhitungan *Armitage's trend test* yang digunakan pada penelitian tersebut menggunakan program yang disebut dengan “*DeFinetti*” yang tersedia secara *online* (http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa_1.pl) (Holst *et al.*, 2010).

Tabel 4.3. Nilai *P-Value* dan nilai OR pada genotip TT dan Non TT

Genotip	CRC	Kontrol	Raw		Adjusted*	
			<i>P-Value</i>	OR (95% CI)	<i>P-Value</i>	OR (95% CI)
TT	11	23	0,025	0,420 (0,193 <OR< 0,911)	0,047	0,431 (0,188 <OR< 0,988)
Non TT	98	86				
Total	109	109				

Keterangan: * dikoreksi menggunakan perhitungan *binary logistic regression*

Hasil perhitungan total 218 sampel didapatkan nilai *P-Value* pada genotip TT terhadap Non TT adalah sebesar 0,025 ($P < 0,05$), yang signifikan secara statistik menurunkan resiko terhadap CRC dengan nilai OR 0,420 (0,193 <OR< 0,911) (Tabel 4.3). Namun karena rerata usia yang sangat berbeda secara signifikan antara kelompok CRC dan Kontrol seperti yang terlihat pada Tabel 4.1, maka perlu dikoreksi dengan perhitungan *binary logistic regression* untuk menghilangkan faktor usia yang mempengaruhi besaran nilai *P-Value* dan OR. Hasil koreksi didapatkan nilai *P-Value* sebesar 0,047 yang tetap signifikan secara statistik menurunkan resiko terhadap CRC sporadik dengan nilai OR 0,431 (0,188 <OR< 0,988). Hal ini berarti, seseorang yang memiliki genotip TT pada SNP “X” dapat menurunkan kerentanan terhadap CRC sporadik, dengan nilai *P-Value* yang hampir mendekati mendekati taraf signifikansi 0,05. Nilai *P-Value* yang mendekati taraf signifikansi ini disebabkan karena adanya perbedaan usia yang signifikan antara kelompok CRC dengan kelompok Kontrol, sehingga perlu dikoreksi dengan perhitungan *binary logistic regression*. Disamping itu, metode

sampling pada kelompok Kontrol lebih sederhana karena jumlah sampel keseluruhan yang hanya berjumlah 119 orang. Dengan melalui proses inklusi dan eksklusi saja, sudah didapatkan jumlah sampel yang diinginkan yaitu sebanyak 109 sampel. Jadi, proses samplingnya hanya bersifat *quota sampling* (Hunt & Tyrrell, 2004). Untuk itu, dalam penelitian selanjutnya diperlukan sampel yang lebih banyak khususnya pada kelompok Kontrol sehingga dapat diperoleh rerata usia yang homogen dengan kelompok CRC. Jika rerata usia antara kedua kelompok homogen, maka akan meningkatkan nilai signifikansi secara statistik, karena tidak perlu lagi dikoreksi dengan perhitungan *binary logistic regression*. Disamping itu, dengan jumlah sampel yang lebih banyak maka akan memperbaiki metode sampling pada kelompok Kontrol.

Berbeda dengan kelompok CRC yang melibatkan proses sampling yang lebih kompleks yaitu *proportional stratified random sampling*, sehingga keterwakilan sampel yang diperoleh lebih presisi (Bolton dan Bon, 2010). Hal tersebut dimungkinkan untuk dilakukan, karena jumlah sampel kelompok CRC setelah proses inklusi dan eksklusi melebihi jumlah yang diinginkan yaitu 174 orang dari target 109 orang.

Tabel 4.4. Nilai *P-Value* dan nilai OR pada genotip GT dan Non GT

Genotip	CRC	Kontrol	<i>P-Value</i>	OR (95% CI)
GT	44	45	0,890	0,963 (0,561 <OR< 1,652)
Non GT	65	64		
Total	109	109		

Nilai *P-Value* pada kelompok genotip GT terhadap Non GT sebesar 0,890 menunjukkan tidak adanya perbedaan secara nyata karena nilainya $>0,05$ (Tabel 4.4). Hal ini berarti bahwa seseorang yang memiliki genotip GT pada SNP “X” tidak berasosiasi pada kerentanan terhadap CRC sporadik, walau memiliki nilai OR sebesar 0,963 (0,561 <OR< 1,652).

Nilai *P-Value* pada kelompok genotip GG terhadap Non GG sebesar 0,076 tidak signifikan secara statistik meningkatkan resiko terhadap CRC, walau dengan nilai OR sebesar 1,628 (0,949 <OR< 2,793) (Tabel 4.5). Hal ini menunjukkan bahwa seseorang yang memiliki genotip GG pada SNP “X” tidak memiliki asosiasi meningkatkan resiko kerentanan terhadap CRC sporadik, walau nilainya mendekati ambang batas signifikansi secara statistik dan nilai OR lebih besar dari 1. Nilai signifikansi akan diperoleh jika sampel yang digunakan lebih banyak, baik pada kelompok Kontrol maupun CRC. Disamping itu, data rekam medik yang lebih lengkap juga diperlukan untuk menganalisa lebih jauh faktor genetik dengan pengaruh luar yang memiliki resiko terhadap CRC sporadik seperti pola makan, gaya hidup yang meliputi data tentang kebiasaan merokok, konsumsi alkohol, dan kebiasaan olahraga.

Tabel 4.5. Nilai *P-Value* dan nilai OR pada genotip GG dan Non GG

Genotip	CRC	Kontrol	<i>P-Value</i>	OR (95% CI)
GG	54	41	0,076	1,628 (0,949 <OR< 2,793)
Non GG	55	68		
Total	109	109		

SNP “X” merupakan SNP baru yang ditemukan pada penelitian pendahuluan dan belum pernah dilaporkan memiliki asosiasi dengan kerentanan terhadap CRC sporadik dalam publikasi ilmiah sebelumnya. Studi lanjutan sangat diperlukan untuk melihat pola variasi genetiknya di populasi lainnya di wilayah Indonesia. Penemuan SNP ini tidak serta merta dapat dimanfaatkan untuk aplikasi dalam kedokteran dan kesehatan. Satu hal yang harus dipahami bahwa bagaimanapun juga, hasil GWAS bukan merupakan prediktor mutlak dari penyakit karena faktor lingkungan turut berperan dalam perkembangan penyakit kompleks seperti kanker. Untuk itu, variasi genetik seperti SNP hanya memberikan kontribusi yang kecil untuk keseluruhan resiko pada seseorang,

karena hanya berupa estimasi secara statistik (Norrsgard, 2008). Sebagai contoh, keterkaitan hubungan antara alel e4 dari gen apolipoprotein E (*ApoE*) yang ditemukan pada kromosom 19 dengan perkembangan penyakit Alzheimer. Penelitian telah menunjukkan bahwa alel E4 dari *ApoE* secara signifikan meningkatkan resiko seseorang terhadap penyakit Alzheimer, namun masih belum jelas bagaimana *ApoE* mempengaruhi pembentukan plak pada otak, yang menjadi ciri khas penyakit Alzheimer (*National Institute on Aging*, 2011).

Hal lain yang membuat suatu penyakit sulit untuk dimengerti keterkaitannya dengan suatu SNP adalah jika SNP tersebut tidak berada di dalam ekson suatu gen, melainkan di luar gen. Jika demikian maka diperlukan studi lanjutan untuk memeriksa kemungkinan bahwa SNP ini berada di bagian promoter atau *enhancer* yang mempengaruhi regulasi gen di dekatnya (Norrsgard, 2008).

SNP “X” juga tidak berada pada gen, tetapi di luar gen. SNP “X” berjarak sekitar 2,5 kpb dari dari ujung 3’ gen *ACTC1* yang berperan dalam kontraksi otot jantung. Kelainan pada gen ini menyebabkan gangguan pada fungsi jantung (Mattson *et al.*, 2008; Morita *et al.*, 2008). Sejauh ini belum ada publikasi ilmiah terkait asosiasi antara gen *ACTC1* dengan kerentanan terhadap CRC sporadik. Gen lainnya yang terdekat dengan SNP “X” adalah *GJD2*, yang berjarak sekitar 31kpb dari ujung 5’ *GJD2*. Sebelumnya, gen ini dinamakan dengan *GJA9* (NCBI, 2012). Gen ini mengkode protein *connexin 36* (Cx36) yang merupakan protein *gap junction* yang membentuk *connexon* sebagai penghubung interselular. Beberapa penelitian menemukan bahwa pada CRC, bagian promoter di gen ini yang kaya akan sekuen GC sangat termetilasi (Borinstein *et al.*, 2010; Sirnes *et al.*, 2011). Bahkan komunikasi interselular yang memanfaatkan protein ini mengalami penurunan ekspresi di CRC (Kanczuga-Koda *et al.*, 2005; Kanczuga-Koda *et al.*, 2010). Untuk itu diperlukan studi lanjutan untuk melihat pengaruh SNP “X” terhadap SNP yang ada di gen *GJD2* atau pengaruh SNP “X” terhadap ekspresi *GJD2* atau gen lainnya yang memiliki asosiasi dengan kerentanan terhadap CRC sporadik.

Studi lanjutan tersebut adalah berupa pemetaan *Linkage disequilibrium* (LD), yaitu asosiasi non acak antara satu alel dengan alel lain pada lokus yang

berbeda yang dapat mengetahui bahwa mutasi pada seseorang yang didapat melalui keturunan dikelilingi oleh alel lainnya di lokus terdekat, sehingga mewakili haplotip dari wilayah kromosom leluhur dimana mutasi pertama kali terjadi (Slatkin, 2008; Fareed dan Afzal, 2012). Dua situs polimorfik dikatakan di dalam LD ketika alel spesifik mereka berasosiasi dalam suatu populasi (Fareed dan Afzal, 2012). Tingginya nilai LD berarti bahwa alel-alel pada SNP hampir selalu diwariskan bersama-sama, informasi mengenai alel dari satu SNP pada seseorang sangat mudah diprediksi dari alel dari SNP lainnya pada kromosom tersebut. Contoh pertama dari LD antara polimorfisme DNA dan mutasi yang menyebabkan penyakit dijelaskan melalui hubungan antara alel dari RFLP pada gen β -globin dan bentuk sel sabit pada hemoglobin (Kan dan Dozy, 1978).

Pemanfaatan profil genetik akan terus berkembang seiring dengan berkembangnya pengetahuan dari para peneliti tentang interaksi faktor-faktor genetik dan lingkungan yang berkontribusi pada pengembangan suatu penyakit sehingga *Personalized medical care* akan menjadi sebuah keniscayaan (Norrsgard, 2008). Penemuan beberapa SNP melalui GWAS telah dimanfaatkan bukan saja untuk mendeteksi suatu penyakit, bahkan telah digunakan untuk tindakan preventif dan kuratif pada dunia kedokteran dan kesehatan masa depan.

Ulasan yang dilaporkan oleh Fareed dan Afzal (2012) mengatakan bahwa beberapa SNP telah ditemukan memiliki asosiasi yang kuat terhadap beberapa penyakit diantaranya adalah SNP rs3077 di gen *HLA-DPA1* dan SNP rs9277535 di gen *HLA-DPBI* pada Hepatitis B, SNP rs8099917 di gen *IL28B* pada Hepatitis C, SNP rs2523608 dan SNP rs2523590 di gen *HLA-B* pada HIV-1 dan AIDS, SNP rs934734-A di gen *SPRED2* pada *rheumatoid arthritis*, SNP rs7025486-? Di gen *DAB2IP* pada Penyakit Jantung Koroner, SNP rs10757278-G di gen *CDKN2A/B* pada penyakit *Myocardial*, SNP rs601338A>G di gen *FUT-2* dan SNP rs4402960-T di gen *IGF2BP2* pada diabetes tipe-1 dan tipe-2, SNP rs889312-A di gen *MAP3KI* pada kanker payudara, dan SNP rs4324798-A di gen *TRNAA-UGC* pada kanker paru-paru. Dalam ulasan tersebut disebutkan pula beberapa kandidat gen yang menjadi target farmakogenomik beserta terapi obat yang direkomendasikan.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

SNP “X” pada kromosom 15 berasosiasi dengan kerentanan terhadap CRC sporadik. Seseorang yang memiliki genotip TT pada SNP “X” berasosiasi menurunkan kerentanan terhadap CRC sporadik secara signifikan, walaupun setelah dikoreksi dengan penghitungan statistik menggunakan *binary logistic regression*.

5.2. Saran

Diperlukan studi lanjutan pada populasi lainnya di wilayah Indonesia untuk pemetaan pola variasi genetik di SNP “X”, mengetahui pengaruh SNP “X” di gen-gen terdekat yaitu *ACTC1* dan *GJD2* yang berkontribusi terhadap CRC sporadik. Diperlukan jumlah sampel yang lebih banyak, khususnya pada kelompok Kontrol untuk mendapatkan rentang usia yang homogen dengan kelompok CRC, sehingga tidak perlu dikoreksi dengan perhitungan *binary logistic regression*.

DAFTAR PUSTAKA

- Affymetrix, Inc. 2012. *Genome-wide human snp array 5.0: learn more*. Diakses tanggal 8 Agustus 2012.
<http://www.affymetrix.com/estore/browse/staticHtmlContentTemplate.jsp?staticHtmlMediaId=m821208&isHtmlStatic=true&navMode=35810&aId=productsNav>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Rafi, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Cancer*. In *Molecular biology of the cell* (5 ed., pp. 1225, 1252, 1255). New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Amis Jr, ES., Butler PF., Applegate KE., Birnbaum SB., Brateman LF., Hevezi JM., et al. (2007). *American college of radiology white paper on radiation dose in medicine*. *J Am Coll Radiol.* 4 (5): 272-284. DOI 10.1016/j.jacr.2007.03.002.
- Arjoso, S., Sudoyo, A. W., & Satria, Y. (Editor.). (2008). *Informasi dasar tentang kanker: pedoman bagi penyuluh kanker* (2 ed.). Jakarta: Yayasan Kanker Indonesia (YKI) dan *Program for Appropriate Technology in Health*.
- Astler VB, Coller FA. (1954). *The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum*. *Ann Surg.* 139:846–852.
- Beck, D. E. (Editor). (2003). *Handbook of colorectal surgery second edition, revised and expanded* (p. 3). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Beck, D. E., L.Roberts, P., Rombeau, J. L., Stamos, M. J., & Wexner, S. D. (Editor). (2009). *The ASCRS manual of colon and rectal surgery* (Pp: 468-476, 545-552). New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Bedeir A & Krasinskas A M. (2011). *Molecular diagnostics of colorectal cancer*. *Arch Pathol Lab Med.* Vol. 135.
- Berg, M., Danielsen, S. A., Ahlquist, T., Merok, M. A., Agesen, T. H., Vatn, M. H., et al. (2010). *DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset*. *PLoS ONE*, 5 (11), e13978.
- Bilbao A G, Armananzas R, Ispizua Z, Calvo B, Varona A A, Inza I, et al. (2012). *Identification of a biomarker panel for colorectal cancer diagnosis*. *BMC Cancer*, 12:43. doi:10.1186/1471-2407-12-43.
- Bodmer WF. (2006). *Cancer genetics: Colorectal cancer as a model*. *J Hum Genet* 51(5): 391-396.
- Bolton S & Bon C. (2010). *Pharmaceutical statistics: Practical and clinical applications* (5th Edition; pp.75-76; 138-139). New York: Informa Healthcare USA.
- Borinstein S C, Conerly M, Dzieciatkowski S, Biswas S, Washington M K, Trobridge P, et al. (2010). *Aberrant DNA methylation occurs in colon*

- neoplasms arising in the azoxymethanecolon cancer model. Molecular Carcinogenesis* 49:94–103.
- Brenner DJ, Hall EJ. (2007). *Computed tomography: An increasing source of radiation exposure. N Engl J Med.* 357: 2277–2284.
- Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, Webb E, Howarth K, Rowan A, *et al.* (2007). *A genome-wide association study shows that common alleles of smad7 influence colorectal cancer risk. Nat Genet.* 39: 1315-1317.
- Brooks LD. (2003). *SNPs: Why do we care?* In Kwok PY (Editor, Chapter 1, pp: 1, 2, 3). (2003). *Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols.* New Jersey: Humana Press Inc.
- [CDC] *Centers for Disease Control and Prevention.* (2011). Epi info™. Diakses tanggal 7 April 2011.
<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>
- [CDC] *Centers for Disease Control and Prevention.* (2012). Epi info™ 7. Diakses tanggal 6 November 2012.
<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/7/index.htm>
- Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, *et al.* (1994). *The DCC Gene: Structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. Genomics.* 19 (3): 525-533. Di dalam Pignatelli M, Banu N & Melegh Z. (2008). *The molecular pathology of sporadic and hereditary colorectal cancer.* Di dalam Jankowski J, Sampliner R, Kerr D, dan Fong Y (Editor). (2008). *Gastrointestinal oncology: A critical multidisciplinary team approach (Chapter 12, pp: 305-306, 308, 310-311, 313).* Blackwell Publishing, ISBN: 978-1-4051-2783-7.
- Cicek M S., Cunningham J M., Fridley B L., Serie D J., Bamlet W R., Diergaard B, *et al.* (2012). *Colorectal cancer linkage on chromosomes 4q21, 8q13, 12q24, and 15q22. Plos One Journal.* 7 (5). e38175.
- Cree IA. 2011. *Improved blood tests for cancer screening: general or specific?* *BMC Cancer.* 11: 499. doi: 10.1186/1471-2407-11-499.
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. *OpenEpi: Open source epidemiologic statistics for public health, Version 2.3.1. Updated 2011/23/06, accessed 2012/11/21.*
<http://www.OpenEpi.com>
- Dukes C. (1932). *The classification of cancer of the rectum. J Pathol Bacteriol.* 35: 323–332.
- Easton DF, Eeles RA. (2008). *Genome-wide association studies in cancer. Hum Mol Genets.* 17(R2): R109–R115.
- Fareed M & Afzal M. (2012). *Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: a tool for broad spectrum service. Egypt J Med Hum Genet.*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.08.001>
- Farrar WD, Sawhney MS, Nelson DB, Lederle FA, Bond JH. (2006). *Colorectal cancers found after a complete colonoscopy. Clin Gastroenterol Hepatol.* 4

- (10): 1259–1264. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. (2001). *The ABC of APC. Hum Mol Genet.* 10(7): 721-733.
- Fearon E R. (2011). *Molecular genetics of colorectal cancer. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6: 479-507. Doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
- Fearon ER, Vogelstein B. (1990). *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell.* 61(5): 759–767.
- Flamini, E., Calistri, D., Marcatali, L., Rengucci, C., & Amadori, D. (2009). *Colorectal Cancer Diagnosis Using DNA.* Di dalam Hayat M.A (Editor). 2009. *Methods of cancer diagnosis, therapy, and prognosis colorectal cancer* (Vol. 4 , pp. 66-67). New Jersey: Springer Science + Business Media B.V.
- [FDA] *Food and Drug Administration.* 2008. *E15 definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories.* Diakses pada tanggal 17 Oktober 2012. <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm129286.pdf>
- Göhlmann H & Talloen W. (2009). *Gene expression studies using affymetrix microarrays* (pp.18). Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, LLC.
- Gryfe R. (2009). *The chromosomal-instability pathway and apc gene mutation in colorectal cancer.* Di dalam J. D. Potter, & Lindor N. M. (Eds.), *Genetics of colorectal cancer* (Ch. 3; pp.61). New York: Springer Science + Business Media; LLC.
- Greene F. L; Compton C. C; Fritz A. G; Shah J. P; dan Winchester D. P (Editor). (2006). *AJCC cancer staging atlas* (Ch.12; pp. 108, 111-112, 114-116). Chicago: Springer Science+Business Media, Inc.
- Haiman CA, Le Marchand L, Yamamoto J, Stram DO, Sheng X, Kolonel LN, *et al.* (2007). *A common genetic risk factor for colorectal and prostate cancer. Nat Genet.* 39: 954-956.
- Hamilton S. R., & Aaltonen L. A (Editor). (2000). *World health organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the digestive system* (Ch. 6; pp. 104, 109-111). Lyon: IARC Press.
- Halligan S, Altman DG, Taylor SA, Mallett S, Deeks JJ, Bartram CI, *et al.* (2005). *CT colonography in the detection of colorectal polyps and cancer: systematic review, meta-analysis, and proposed minimum data set for study level reporting. Radiology.* 237 (3): 893–904.
- Hardcastle, J. D., Chamberlain, J. O., Robinson, M. H., Moss, S. M., Amar, S. S., Balfour, T. W., *et al.* (1996). *Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. Lancet.* 348 (9040): 1472–1477.
- Ho JW, Choi S-c, Lee Y-f, Hui TC, Cherny SS, Garcia-Barcelo M-M, *et al.* (2011). *Replication study of snp associations for colorectal cancer in hong kong chinese. British Journal of Cancer.* 104: 369-375.

- Holst S v, Picelli S, Edler D, Lenander C, Dalen J, Hjern F, *et al.* (2010). *Association studies on 11 published colorectal cancer risk loci. British Journal of Cancer.* 103: 575-580.
- Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, Lubbe S, *et al.* (2008). *Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. Nat Genet.* 40: 1426-1435.
- Hunt N and Tyrrell S. (2004). *Discuss sampling method: stratified sampling. Coventry University Module.* Retrieved June 20 2012.
<http://www.coventry.ac.uk/ec/~nhunt/meths/strati.html>
- [IDT] *Integrated DNA Technologies.* (2011). *A basic polymerase chain reaction protocol.* Diakses tanggal 2 Februari 2011.
<http://eu.idtdna.com/Pages/docs/educational-resources/a-basic-pcr-protocol.pdf>
- [IDT] *Integrated DNA Technologies.* (2011b). *OligoAnalyzer 3.1.* Diakses tanggal 2 Februari 2011.
<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
- [IARC] *International Agency for Research on Cancer.* (2008a). *GLOBOCAN 2008 Fast stat: World. Retrieved February 10, 2012, from GLOBOCAN 2008: Country Fast Stat.*
<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
- [IARC] *International Agency for Research on Cancer.* (2008b). *Cancer fact sheets; Colorectal cancer. Retrieved February 11, 2011, from GLOBOCAN 2008 Cancer Fact Sheets: Section of Cancer Information.*
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>
- [IARC] *International Agency for Research on Cancer.* (2008c). *GLOBOCAN 2008 Fast stat: Indonesia. Retrieved February 2, 2011, from GLOBOCAN: Country Fast Stat. Section of Cancer Information.*
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=360>
- Ivkovic T C, Loncar B, Spaventi R, dan Kapitanovic S. (2009). *Association of H-Ras polymorphisms and susceptibility to sporadic colon cancer. International Journal of Oncology.* 35: 1169-1173. DOI: 10.3892/ijo_00000433.
- Jaeger E, Webb E, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Rowan A, Broderick P, *et al.* (2008). *Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. Nat Genet.* 40: 26-28.
- Jänne PA. & Mayer RJ. (2000). *Chemoprevention of colorectal cancer. N Engl J Med.* Jun 29; 342(26):1960-1968.
- Jass JR. (2007). *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Histopathology.* 50: 113-130.
- Javed M. & Mukesh. (2010). *Current research status, databases and application of single nucleotide polymorphism. Pakistan Journal of Biological Sciences.* 13 (13): 657-663.

- Kan YW, Dozy AM. (1978). *Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. Proc Natl Acad Sci USA.*;75:5631–5. Di dalam Fareed M & Afzal M. (2012). *Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: a tool for broad spectrum service. Egypt J Med Hum Genet.*
- Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sulkowska M. (2005). *Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. Oncology.* 68: 217-222.
- Kanczuga-Koda L, Koda M, Sulkowski S, Wincewicz A, Zalewski B, Sulkowska M. (2010). *Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer—shift from membranous CX32 and CX43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. In Vivo.* 24: 101-107.
- Kane M F., Loda M, Gaida G M., Lipman J, Mishra R, Goldman H, *et al.* (1997). *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Research.* 57: 808-811.
- Kang M Y, Lee B B, Ji Y I, Jung E H, Chun H-K, Song S Y, *et al.* (2008). *Association of interindividual differences in p14^{arf} promoter methylation with single nucleotide polymorphism in primary colorectal cancer. Cancer.* 112 (8): 1699-1707. DOI 10.1002/cncr.23335.
- [KKAKI] Kelompok Kerja Adenokarsinoma Kolorektal Indonesia. 2004. *Pengelolaan karsinoma kolorektal: suatu panduan klinis nasional.* Diakses tanggal 9 Mei 2012].
[http://hompedin.org/download/Panduan%20KKR%20\(radioterapi%20update\).doc](http://hompedin.org/download/Panduan%20KKR%20(radioterapi%20update).doc)
- Kim J C, Kim S Y, Cho D H, Roh S A, Choi E Y, Jo YK, *et al.* (2010). *Genome-wide identification of chemosensitive single nucleotide polymorphism markers in colorectal cancers. Cancer Sci.* 101 (4): 1007–1013. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01461.x.
- Kim MS, Lee J, dan Sidransky D. (2010). *DNA methylation markers in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev.* 29:181–206.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1996). *Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell* 87: 159–170.
- Kirklin JW, Dockerty MB, Waugh JM. (1949). *The role of the perineal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. Surg. Gynecol. Obstet.* 88: 326–331.
- Kronborg, O, Fenger, C, Olsen, J, Jorgensen, O. D, dan Sondergaard, O. (1996). *Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. Lancet,* 348 (9040): 1467–1471.
- Kumar V, Becker T, Jansen S, van Barneveld A, Boztug K, Wolf S, *et al.* (2008). *Expression levels of fas are regulated through an evolutionary conserved*

element in intron 2, which modulates cystic fibrosis disease severity. Genes and Immunity. 9: 689–696.

- Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, *et al.* (2008). *Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma. Cancer Sci. 99 (9): 1835–1840.*
- Lea, I. A., Jackson, M. A., & Dunnick, J. K. (2009). *Genetic pathways to colorectal cancer. Mutat Res. 670 (1-2): 96–98.*
- Le Marchand L. (2009). *Genome-wide association studies and colorectal cancer. Surg Oncol Clin N Am. 18(4): 663-668.*
- Levin B, Lieberman DA., McFarland B, Andrews KS., Brooks D, Bond J, *et al.* (2008). *Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps: A joint guideline from the american cancer society, the us multi-society task force on colorectal cancer, and the american college of radiology. Gastroenterology. 134: 1570–1595. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.002.*
- Life Technologies. 2012. Learn about DNA sequencing: Electrophoresis. © Life Technologies Corp. All Rights Reserved. Diakses pada tanggal 15 Mei 2012. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-andServices/Applications/Sequencing/Capillary-Electrophoresis-Sequencing/Learn-AboutDNA - Sequencing/Electrophoresis.html>*
- Markowitz S D., dan Bertagnolli M M. (2009). *Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med. 361: 2449-2460.*
- Matsson H, Eason J, Bookwalter CS, Klar J, Gustavsson P, Sunnegårdh J, *et al.* (2008). *Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. Hum Mol Genet. 17(2): 256-265.*
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, and Coppede F. (2011). *Review article: genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol 2011, Article ID 792362, 19 pages. doi:10.1155/2011/792362.*
- Morita H, Rehm HL, Menesses A, McDonough B, Roberts AE, Kucherlapati R, *et al.* (2008). *Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. N Engl J Med. 358(18): 1899-1908.*
- Moses S. 2009. *Fecal occult blood. family practice notebook.. Last revised on 3/9/2009 and last published on 2/20/2012. Retrieved in February 24 2012. <http://www.fpnotebook.com/gi/lab/FclOcltBld.htm>*
- Narayan S, Roy D. (2003). *Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. Mol Cancer. 12(2): 41.*
- [NCBI] *National Center for Biotechnology Information. (2005). General information about single nucleotide polymorphisms: what is a snp, and how are they used in research? SNP FAQ Archive [Internet], Retrieved on February 1st 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44382/>*

- [NCBI] *National Center for Biotechnology Information*. (2007a). *SNPs: variations on a theme*. Retrieved on February 1st 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/snps.html>
- [NCBI] *National Center for Biotechnology Information*. (2007b). *Microarray*. retrieved July 19 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>
- [NCBI] *National Center for Biotechnology Information*. (2012). *Gap junction protein, delta 2, 36kDa [Homo sapiens]*. Diakses pada tanggal 30 Oktober 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57369>
- [NCI] *National Cancer Institute*. (2010). *Cancer staging*. NCI factsheet. Retrieved February 12 2012.
<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/staging>
- [NHGRI] *National Human Genome Research Institute*. (2011). *Genome-wide association studies*. Retrieved May 15 2012.
<http://www.genome.gov/20019523>
- [NIA] *National Institute on Aging*. (2011). *Alzheimer's disease genetics facts sheet*. Diakses pada tanggal 21 November 2012.
<http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>
- Norrsgard, K. (2008). *Genetic variation and disease: GWAS*. *Nature Education* 1 (1). Diakses pada 13 Juni 2012.
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-variation-and-disease-gwas-682>
- Nivatvongs S. (2007). *Diagnosis*. Di dalam P. H. Gordon, & S. Nivatvongs, *Principles and practice of surgery for the colon, Rectum, and Anus* (3 ed., p. 70). New York: *Informa Healthcare*, Inc.
- Peters U, Hutter C M., Hsu L, Schumacher F R., Conti D V., Carlson C S., *et al*. (2012). *Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk*. *Hum Genet*. 131:217–234. DOI 10.1007/s00439-011-1055-0.
- Pickhardt PJ., Choi JR., Hwang I, Butler JA., Puckett ML., Hildebrandt HA., *et al*. (2003). *Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults*. *N Engl J Med*. 349: 2191-2200.
- Pickhardt PJ, Nugent PA, Mysliwiec PA, Choi JR, Schindler WR. (2004). *Location of adenomas missed by optical colonoscopy*. *Ann Intern Med*. 141 (5): 352–359.
- Pignatelli M, Banu N & Melegh Z. (2008). *The molecular pathology of sporadic and hereditary colorectal cancer*. Di dalam Jankowski J., Sampliner R., Kerr D., dan Fong Y (Editor). 2008. *Gastrointestinal oncology: a critical multidisciplinary team approach (Chapter 12, pp: 305-306, 308, 310-311, 313)*. *Blackwell Publishing*, ISBN: 978-1-4051-2783-7.

- Polakis P. (2007). *The many ways of wnt in cancer*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 45-51.
- Polakova V, Pardini B, Naccarati A, Landi S, Slyskova J, Novotny J, *et al.* (2009). *Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the czech republic*. *Hum Mutat.* 30 (4): 661–668. DOI 10.1002/humu.20931.
- Pritchard C C & Grady W M. 2011. *Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice*. *Gut.* 60: 116-129. doi:10.1136/gut.2009.206250.
- Qiagen. (2001). *QIAamp[®] DNA mini kit and qiaamp dna blood mini kit handbook*. California: QIAGEN.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2002). *RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. *Nature*, 418: 934.
- Randi G, Edefonti V, Ferraroni M, Vecchia C L, dan Decarli A. (2010). *Dietary patterns and the risk of colorectal cancer and adenomas*. *Nutrition Reviews* Vol. 68(7): 389–408. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00299.x.
- Rodriguez S, Gaunt T R., dan Day I N. M. (2009). *Hardy-Weinberg Equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies*. *Am. J. Epidemiol.* 169 (4): 505-514. DOI 10.1093/aje/kwn359. <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>
- Roock, W. D., Vriendt, V. D., Normanno, N., Ciardiello, F., & Tejpar, S. (2011). *KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: Implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer*. *Lancet Oncol.* 12(6): 594-603.
- Rustgi AK. (2007). *The genetics of hereditary colon cancer*. *Genes Dev.* 21: 2525-2538.
- Sasieni PD. (1997). *From genotypes to genes: Doubling the sample size*. *Biometrics.* 53: 1253– 1261.
- Scottish Cancer Group, Cancer Genetics Sub-Group. 2001. *Cancer genetics services in scotland: guidance to support the implementation of genetic services for breast, ovarian and colorectal cancer predisposition*. *Edinburgh: The Scottish Executive*. [Cited on 11 May 2012]. http://www.show.scot.nhs.uk/sehd/mels/HDL2001_24Guidefull.pdf
- Slatkin M. (2008). *Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future*. *Nat Rev Genet.* (6): 477-85.
- Segditsas S, Tomlinson I. (2006). *Colorectal cancer and genetic alterations in the wnt pathway*. *Oncogene.* 25: 7531-7537.
- Sirnes S, Honne H, Ahmed D, Danielsen S A, Rognum T O, Meling G I, *et al.* (2011). *DNA methylation analyses of the connexin gene family reveal silencing of GJC1 (Connexin45) by promoter hypermethylation in colorectal cancer*. *Epigenetics.* 6: 5, 602-609.
- Stanke F, Hedtfeld S, Becker T, dan Tümmler B. 2011. *An association study on contrasting cystic fibrosis endophenotypes recognizes krt8 but not krt18 as a*

modifier of cystic fibrosis disease severity and CFTR mediated residual chloride secretion. BMC Medical Genetics: 12: 62.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/62>

Stirling D. 2003. *Sequencing: A technical overview*. In Bartlett J. M. S. & Stirling D. (Editor). 2003. *Methods in Molecular Biology (Vol 226): PCR Protocols 2nd Ed (Chap. 49, pp: 337-339)*. New Jersey: Humana Press.

Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, *et al.* (1999). *The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. Proc Natl Acad Sci USA. 96 (26): 15121-15126.*

Sung M-K and Bae Y-J. 2010. *Linking obesity to colorectal cancer: Application of nutrigenomics. Biotechnol. J. 5 (9): 930–941. DOI 10.1002/biot.20100165.*

Suriapranata , Tjong WY, Wang T, Utama A, Raharjo SB, dan Tai SSW. (2011). *Genetic factors associated with patient-specific warfarin dose in ethnic indonesians. BMC Medical Genetics. 12: 80.*
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/80>

Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. (2006). *Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. J Gastroenterol. 41(3): 185–192.*

Talbot I, Ashley Price, dan Manuel Salto-Tellez. (2007). *Biopsy pathology in colorectal disease (2nd Edition, Ch. 2 pp. 6; Ch.18 pp. 6, 331, 335). Oxford University Press Inc., 198 Madison Avenue, New York, NY10016.*

Tao H, Shinmura K, Suzuki M, Kono S, Mibu R, Tanaka M, *et al.* (2008). *Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene mutyh and increased colorectal cancer risk in a japanese population. Cancer Sci. 99 (2): 355–360.*

[ACS] *The American Cancer Society.* (2011). *Colorectal cancer overview. Retrieved April 22, 2011.*
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003047-pdf.pdf>

[TGen] *The Translational Genomics Research Institute.* (2004). *How affymetrix gene chip® dna microarrays work. Retrieved July 18 2012.*
<http://public.tgen.org/tgen.org/downloads/autism/Genotypingessentials.pdf>

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. (1993). *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science. 260: 816-819.*

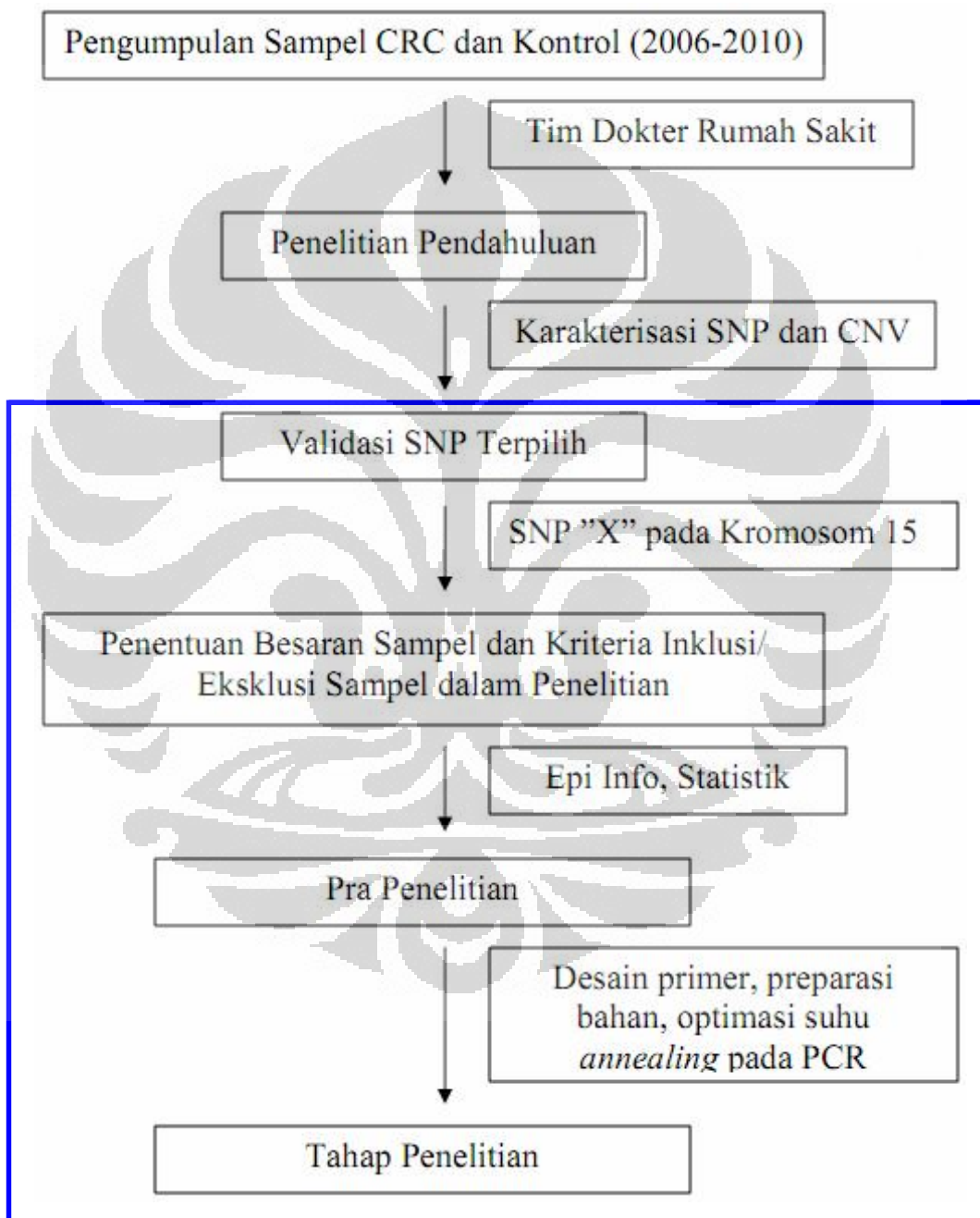
Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, *et al.* (2007). *A genome-wide association scan of tag SNP's identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. Nat Genet. 39: 984-988.*

Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittman AM, *et al.* (2008). *A genome-wide association study identifies colorectal*

- cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. Nat Genet.* 40: 623-630.
- Tomlinson IP, Dunlop M, Campbell H, Zanke B, Gallinger S, Hudson T, *et al.* (2010). *COGENT (COlorectal cancer GENEtics): An international consortium to study the role of polymorphic variation on the risk of colorectal cancer. Br J. Cancer.* 102 (2): 447-454.
- Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. (1967). *Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. Ann Surg;* 166: 420-427.
- Vilar E, Gruber SB. (2010). *Microsatellite instability in colorectal cancer: the stable evidence. Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7: 153-162. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70209-6.
- Wade P A. and Kikyo N. (2002). *Minireview: Chromatin remodeling in nuclear cloning. Eur. J. Biochem.* 269: 2284-2287. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02887.x.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, dan Kerr D. (2009). *Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. Nature Reviews: Cancer .* Vol 9: 489-499. doi:10.1038/nrc2645.
- Wang D and DuBois R N. 2012. *Associations between obesity and cancer: The Role of Fatty Acid Synthase. Journal of the National Cancer Institute.* DOI: 10.1093/jnci/djs010. <http://www.jnci.oxfordjournals.org>
- Weissensteiner T, Griffin H G., dan Griffin A (Editor). (2004). *PCR technology: current innovations 2nd edition* (Ch. 7, pp. 66). Florida: CRC Press LLC.
- Weizmann Institute of Science.* (2012). *Actin, alpha, cardiac muscle 1.* diakses pada tanggal 30 Oktober 2012. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTC1>
- Wood L D, Parsons D W, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary R J, *et al.* (2007). *The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science,* 318: 1108-1113.
- [WHO] *World Health Organization.* (2008). *Media centre: Cancer.* Diakses tanggal 2 Februari 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
- Yamamoto S, Midorikawa Y, Morikawa T, Nishimura Y, Sakamoto H, Ishikawa S, *et al.* (2010). *Identification of chromosomal aberrations of metastatic potential in colorectal carcinoma. Genes, Chromosomes & Cancer,* 49 (5): 487-496.
- Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, *et al.* (2007). *Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet.* 39: 989-994.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skematik penelitian CRC di MRIN



Keterangan: Kotak berwarna biru menandakan cakupan yang dilakukan dalam tesis ini. Sedangkan tahap yang berada di luar kotak biru merupakan bagian dari penelitian pendahuluan

Lampiran 2. Panduan skrining

Risk	Procedure	Onset (age, years)	Frequency
I. Low or average: 65–75%	Digital rectal exam and one of the following:	50	Yearly
A. Asymptomatic: no risk factors	Fecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy	50	FOBT yearly, flex-sig every 5 years
B. Colorectal cancer in no first-degree relatives	Total colon exam (colonoscopy or double contrast barium enema and proctosigmoidoscopy)	50	Every 5–10 years
II. Moderate risk: 20%–30% of people			
A. Colorectal cancer in first-degree relative, age 55 or younger, or two or more first-degree relatives of any age	Colonoscopy	40 or 10 years before the youngest case in the family, whichever is earlier	Every 5 years
B. Colorectal cancer in a first-degree relative older than age 55	Colonoscopy	50 or 10 years before the age of the case, whichever is earlier	Every 5–10 years
C. Personal history of large (>1 cm) or multiple colorectal polyps of any size	Colonoscopy	1 year after polypectomy	If recurrent polyps, 1 year If normal, 5 years
D. Personal history of colorectal malignancy, surveillance after resection for curative intent	Colonoscopy	1 year after resection	If normal, 3 years If still normal, 5 years If abnormal, as above

Lampiran 2. Panduan skrining (lanjutan)

Risk	Procedure	Onset (age, years)	Frequency
III. High risk (6–8% of people)			
A. Family history of hereditary adenomatous polyposis	Flexible sigmoidoscopy; consider genetic counseling; consider genetic testing	12–14 (puberty)	Every 1–2 years
B. Family history of hereditary nonpolyposis colon cancer	Colonoscopy; consider genetic counseling; consider genetic testing	21–40	Every 2 years
C. Inflammatory bowel disease		40	Every years
1. Left-side colitis	Colonoscopy	15th	Every 1–2 years
2. Pancolitis	Colonoscopy	8th	Every 1–2 years

FOBT (*Fecal Occult Blood Testing*); Flex-sig (*flexible sigmoidoscopy*).

(Sumber: Beck *et al.*, 2009)

Lampiran 3. Jadwal kerja

No.	Tahapan	2011												2012							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
1	Studi Pustaka																				
2	Merancang dan memesan primer																				
3	Penyiapan bahan																				
4	Perkuliahan																				
5	Eksperimen di laboratorium																				
6	Analisa statistik																				

Lampiran 4. Sekuen referensi SNP "X" di kromosom 15

TCACATGGCCATCAGTCCAACCCCTCTGTTGATTGTTCTCACCTGTATTATGTGTGGGAGCACACAC
 TCACATGCACACACATAGCTGCTGCTCCTCCTGCCACACCACGACTCTCTGTAATTTGTCTTCCA
 GGTCTCCAAGAAAGAGACTTTGTGTTCCCTCTTTGCCTTCCCTTACATCCTGTTATAAAATGCCCTTT
 AATTTTTTTTCTTCCCCTGAGCTTTCTATTCCCTTCATTTTTCTTATTCATTTTTCTTATTTCTCAAG
 AGAACTCAATGTAGAGAAACCATAACAATGTGATTTGAAGAGACTTCCGTAGCCCACCTCTGCC
 CTCTCCAACACCTCCCAACCCAGCCTCCAAAGTTCATGCTAAAAAGAAAGAAATGGGGACGGAAGG
 AAAGTAACTTAATTGAATAATTCAGCTCATACTGGGCATGGTGTGAGTATCTTAAGCACATTTT
 GTTCCATTCTCATGACAACCTCTGAGAACACGATTTTAGTTAGCCCTTCTTTCTGAAGAAGCTAGG
 TGATTTACTTAAAGACCACTCAACTCATCAGTGGCAGAGCTAGGATTTAAACTCAAATCTTTTTGA
 CCCGAAGCCCATGCAACATCAATCCTTTGGGCTAGTCTAATAAGAAACTATATGTAGAAAACTTTG
 GTTAAATTATGCTTGTGTTCTCTGGCAGGGAGATCTGTTGAGCGTTCCCTTGGGAACATAGTTTA
 GGTAAGAGATTGCTTAATTGGcacagtctgctctttgaaggATGCAGGTAAGGATGGATGATAAG
 GTTTGAATCTGTGTCCCCACCAATCTTATGTTGAATTGTAATCCCTAATGTTGGAGGGCTGGTG
 GGAGGTGATTTGATCATGGAGGTGAATTTCTCATGAATGGTTTGGCACCATCCCTTGGTACTGTC
 CTCACGTTAGTGACTGAGTTCTCATGAGATGATGATTTAAAAGTGTGTGGCATCTCCCTGCCCT
 TAGCTCCTGCTCCCACCATGTGAGATGCCTCACTCCCTTTCCTTCTGTGTCATGATTGGAAGCTT
 CCTGAGGCCTCCTCAGAAGCAGAAGCTACTATGCTTCTTTTACAGCCTGCAGAACCATGAGCCAAT
 CaAGTATCTTTTCTTTATAAAATACCCAGTCTCAGGTATTTCTTTTAAACAATGTGAGAATGGACT
 AATACAACAGGTAAGTTTCAATCTGTGACTGGAGTGACAGGGGAGAATGTCCGAGATGGCCAGCATT
 TTGTGGAAGACACTGAAAAGACGACTAAAAGTGTACATCCTAGAGTTCAAGAGGCTTTAGGAAAAT
 TTCATATTTTCGCTAAGGCAGAGCTGCTCTTAAACTTCCATCATGATGCTGTTTTTTCATATCC
 TGACCTCCATGATGCCTCCAGGCCACTTGCAGTAATAGTTCCAAAGTTCCTCAAGTCATCTTCCCTG
 TGTTAAACGCTTACCCTGTTGACCCAATTCCTTGCTTACAATTGACTCTAGAGTTGCTTCTTATC
 TACTATTTAAGCCCTGTTTTAATTCTGCTTTACTTTCAGCCTTCCCTTGGGGTAGTTTTCTTTCTGT
 CTCCCCTCTTTAGTCATGACTTCCATGGAAGTTACAGTAAAACAATGCAGGAAAATAAGCAGACAA
 TGATGCTGAAGGACATGCAGGCCACCCCTACTTAACTCTCAGCTGACCCAGCTCCCcttcaactcc
 agcctcaaccAGGGAGGGGAGGGGGCCAGAACCACAAGAAGTTCAGAGAACTATAGTTGAACTGAA
 GCTCTTTATCCTCCGAGTCAACCTTTCTTGCATCTGCTGCACCCAGGGCTAATGAATGAACTTCAA
 AGAACGTCTTCAAACATCAAGTTCATCAGTGACCAGAGGTGACTTTTGCAACCTCTCCAGGAGCT
 TTGTTTTGGATGTCTTCCATACCATGAGTTTAGTTACCATAGCAACAGCCAGAGAAGCTCTGCCTGG
 AAGAGAGATTTCTTGTATAATGAGCCTGGAAGACCTTAAGGTGAATAGACAACCTTTTGTGTTTTTA
 G

Ket:

Panjang sekuen referensi adalah 2047pb, sedangkan ukuran produk PCR adalah 979pb

Sekuen berwarna merah yang diapit oleh warna biru merupakan posisi SNP

Sekuen berwarna hijau tua yang digarisbawahi merupakan *Left primer*

Sekuen berwarna hijau tua yang digarisbawahi merupakan *Right primer*

Lampiran 5. Kartu insiden

Colorectal Incidence Card	
Registration Number : 08. 20.	Date : ___ / ___ / 2008
Medical Record Number : _____	
Hospital : _____	
1. Name: _____	2. Sex : <input type="checkbox"/> Male <input type="checkbox"/> Female
3. Date of Birth : ___ / ___ / ___	4. Age: _____ Years
5. Marital Status : <input type="checkbox"/> Single. <input type="checkbox"/> Married or <input type="checkbox"/> Widow/Divorce	6. Smoke : <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
	7. Alcohol : <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
8. Ethnic : _____	9. Diet : <input type="checkbox"/> High in red meat <input type="checkbox"/> High in vegetable <input type="checkbox"/> Not sure
10. Address : Street : _____	11. Mobile Phone Number : _____
No: _____ RT: _____ RW: _____	12. Type of Sample : <input type="checkbox"/> Blood Time : _____ : _____
SubDistrict : _____ District : _____	<input type="checkbox"/> Urine Time : _____ : _____
City : _____ Post Code : _____	<input type="checkbox"/> Tissue Time : _____ : _____
Telephone No : _____	
Page 1 from 2	Next Page ►

Colorectal Incidence Card	
13. Diagnosis Result:	<input type="checkbox"/> Colorectal Cancer <input type="checkbox"/> Colon <input type="checkbox"/> Rectal <input type="checkbox"/> Appendix <input type="checkbox"/> Non-cancerous Colorectal Disease <input type="checkbox"/> Adenomatous polyps <input type="checkbox"/> Ulcerative Colitis <input type="checkbox"/> Regional Enteritis <input type="checkbox"/> Others, Specify: _____
14. Diagnosis According	<input type="checkbox"/> Colonoscopy <input type="checkbox"/> Biopsy <input type="checkbox"/> Fecal Occult Blood Test <input type="checkbox"/> Sigmoidoscopy <input type="checkbox"/> Others, Specify: _____
15. Stage of CRC :	<input type="checkbox"/> Dukes' system <input type="checkbox"/> A, <input type="checkbox"/> B, <input type="checkbox"/> C, <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> TNM system <input type="checkbox"/> T0 <input type="checkbox"/> Tis <input type="checkbox"/> T1 <input type="checkbox"/> T2 <input type="checkbox"/> T3 <input type="checkbox"/> T4 <input type="checkbox"/> N0 <input type="checkbox"/> N1 <input type="checkbox"/> N2 <input type="checkbox"/> M0 <input type="checkbox"/> M1
16. Family History of Colorectal Cancer :	<input type="checkbox"/> Yes If Yes, what relation: <input type="checkbox"/> Grand Parent <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Parent <input type="checkbox"/> Sibling
17. Drug or Treatment :	
18. Notes :	
	Sign
	Doctor : _____
Page 2 from 2	(Name)

Lampiran 6. Tahapan isolasi DNA dengan protokol putar (*spin protocol*) menggunakan Qiaamp DNA *blood mini kit* (Qiagen)

Blood and Body Fluid Spin Protocol

Notes:

- *Equilibrate samples to room temperature.*
- *Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.*
- *Equilibrate Buffer AE or water to room temperature for elution in step 10.*
- *Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 24.*
- *If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.*
- *All centrifugation steps should be carried out at room temperature.*
- *Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 9).*
- *200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 29) is recommended if a higher yield is required.*

1. ***Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or Proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.***
2. ***Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5 x 10⁶ lymphocytes in 200 µl PBS.***

If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS. QIAamp spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not the PCR itself. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or Proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. ***Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.***
In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. If the sample volume is larger than 200 µl, increase the amount of QIAGEN Protease (or Proteinase K) and Buffer AL proportionally; e.g., a 400 µl sample will require 40 µl QIAGEN Protease (or Proteinase K) and 400 µl Buffer AL. If sample volumes larger than 400 µl are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi columns is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or Proteinase K directly to Buffer AL.

Lampiran 6. (lanjutan)

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid. 6.

6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 µl, increase the amount of alcohol proportionally; e.g., a 400 µl sample will require 400 µl of alcohol.

7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation. Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) in order to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp spin column is empty.

Note: When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

8. Carefully open the QIAamp spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200 µl.

9. Carefully open the QIAamp spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Continue directly with step 10, or to eliminate any chance of possible Buffer AW2 carryover, perform step 9a, and then continue with step 10.

Note: Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains Buffer AW2, contacting the QIAamp spin column. Removing the QIAamp spin column and collection tube from the rotor may also cause flow-through to come into contact with the QIAamp spin column. In these cases, the optional step 9a should be performed.

9a. (Optional): Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

Lampiran 6. (lanjutan)

10. Place the QIAamp spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp spin column and add 200 μ l Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200 μ l Buffer AE will increase yields by up to 15%. Volumes of more than 200 μ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 μ l increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 3, page 16). For samples containing less than 1 μ g of DNA, elution in 50 μ l Buffer AE

or water is recommended. Eluting with 2 x 100 μ l instead of 1 x 200 μ l does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at -20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200 μ l sample of whole human blood ($\sim 5 \times 10^6$ leukocytes/ml) typically yields 6 μ g of DNA in 200 μ l water (30 ng/ μ l) with an A 260/A280 ratio of 1.7–1.9.

Lampiran 7. Tahapan purifikasi menggunakan *multi screen PCR₉₆ filter plate*

1. Sebelum *plate* digunakan, terlebih dahulu dilakukan pengujian ada tidaknya kebocoran dengan memipet air destilat ke masing-masing sumuran sebanyak 100 μ l dan divakum dengan mengatur tekanan mesin vakum pada rentang -10 sampai dengan -15 inchi Hg
2. Selanjutnya air destilat (dH₂O) dimasukkan sebanyak 100 μ l ke dalam masing-masing sumuran sampel hasil PCR
3. Sampel yang telah ditambahkan dH₂O kemudian diresuspensi dan dipindahkan ke *milipore plate* kemudian jalankan proses vakum dan tunggu hingga kering (indikasi warna agak gelap)
4. Sebanyak 160 μ l dH₂O ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran kemudian *shaking* dengan kecepatan 200 rpm selama 3 menit dan setelah itu dilakukan proses vakum kembali
5. Setelah kering ulangi proses tersebut, kemudian sebanyak 25 μ l air bidestilat (ddH₂O) ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran dan *shaking* dengan kecepatan 200 rpm selama 15 menit.
6. Setelah proses *shaking* selesai, sampel dari *milipore plate* dipindahkan ke *plate* reaksi yang baru kemudian disegel dengan alumunium foil, *dispindown* dengan kecepatan 180 x g selama 10 detik dan disimpan pada suhu -20°C atau langsung digunakan dalam tahapan *cycle sequencing*.

Lampiran 8. Presipitasi EDTA/ etanol

1. Sebanyak 5 μ l EDTA 125 mM dan 10 μ l air destilat ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran dalam *plate*
2. Sebanyak 68 μ l etanol 96% dipipet ke dalam masing-masing sumuran, dan ditutup dengan penutup khusus (MicroAmpTM)
3. Sampel yang sudah ditambahkan EDTA dan etanol tersebut dihomogenkan dengan baik, kemudian disimpan dalam suhu ruang selama 15 menit
4. Sampel dalam *plate* disentrifugasi dengan kecepatan 3000 x g, pada suhu 4°C selama 35 menit, penutup sumuran dibuja dan dibalikkan posisinya kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 180 x g untuk membuang supernatan
5. Sebanyak 103 μ l etanol 70% ditambahkan pada masing-masing sumuran dan tutup sumuran kemudian homogenkan dengan vortex, kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 x g, pada suhu 4°C selama 20 menit
6. Penutup sumuran dibuka dan dibalikkan posisinya kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 180 x g untuk membuang supernatan, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 10 menit untuk menghilangkan sisa etanol
7. Sementara itu larutan stok beku *Hi-Di Formamide* dicairkan dan diresuspensi ke dalam masing-masing sumuran sebanyak 15 μ l, dan disentrifugasi dengan kecepatan 180 x g untuk menghomogenkan dan menurunkan sisa cairan yang menempel pada bagian atas tabung
8. Sampel didiamkan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C selama 10 menit, kemudian didenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit dan segera didinginkan dalam es selama 15 menit, dan sampel siap untuk disekuensing

Lampiran 9. Contoh tabulasi dan perhitungan *Chi-Square Test*, *Odds Ratio*, dan HWE

1. Contoh Rumus Penghitungan *Chi-Square Test*

Observed Genotype	Malignansi		Total	Expected Genotype	Malignansi		Total
	CRC	Kontrol			CRC	Kontrol	
AA	a	b	a+b	AA	f	g	f+g
Non AA	c	d	c+d	Non AA	h	i	h+i
Total	a+c	b+d	a+b+c+d	Total	f+h	g+i	f+g+h+i

Keterangan:

$$f = (a+b) \cdot g$$

$$g = \frac{(a+b) \cdot (b+d)}{a+b+c+d}$$

$$h = (a+c) \cdot f$$

$$i = (b+d) \cdot g$$

Rumus Pearson χ^2 :

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E} \quad (1)$$

Keterangan:

O = Observed genotype
E = Expected genotype

2. Contoh Rumus Perhitungan *Odds Ratio*

Genotype	Malignansi	
	CRC	Kontrol
AA	a	b
Non AA	c	d

$$OR = \frac{(a \times d)}{(b \times c)} \quad (2)$$

Lampiran 9. (lanjutan)

3. Contoh Rumus Perhitungan Nilai HWE

Kelompok	Genotip	Frek	Σ	MAF	HWE		χ^2	p-Value HWE
					Observed	Expected		
Control	11	a	d	1 e	a	g	j	k
	12	b			b	h		
	22	c		2 f	c	i		
CRC	11	a	d	1 e	a	g	j	k
	12	b			b	h		
	22	c		2 f	c	i		

Keterangan:

$$d = a+b+c$$

$$e = ((a*2) +b)/(d*2)$$

$$f = 1-d$$

$$g = (e)^2*d$$

$$h = 2*e*f*d$$

$$i = (f)^2*d$$

$$j = ((a-g)*(a-g)/g+(b-h)*(b-h)/h+(c-i)*(c-i)/i)$$

$$k = \text{CHIDIST}(j,1 \text{ (derajat bebas)})$$

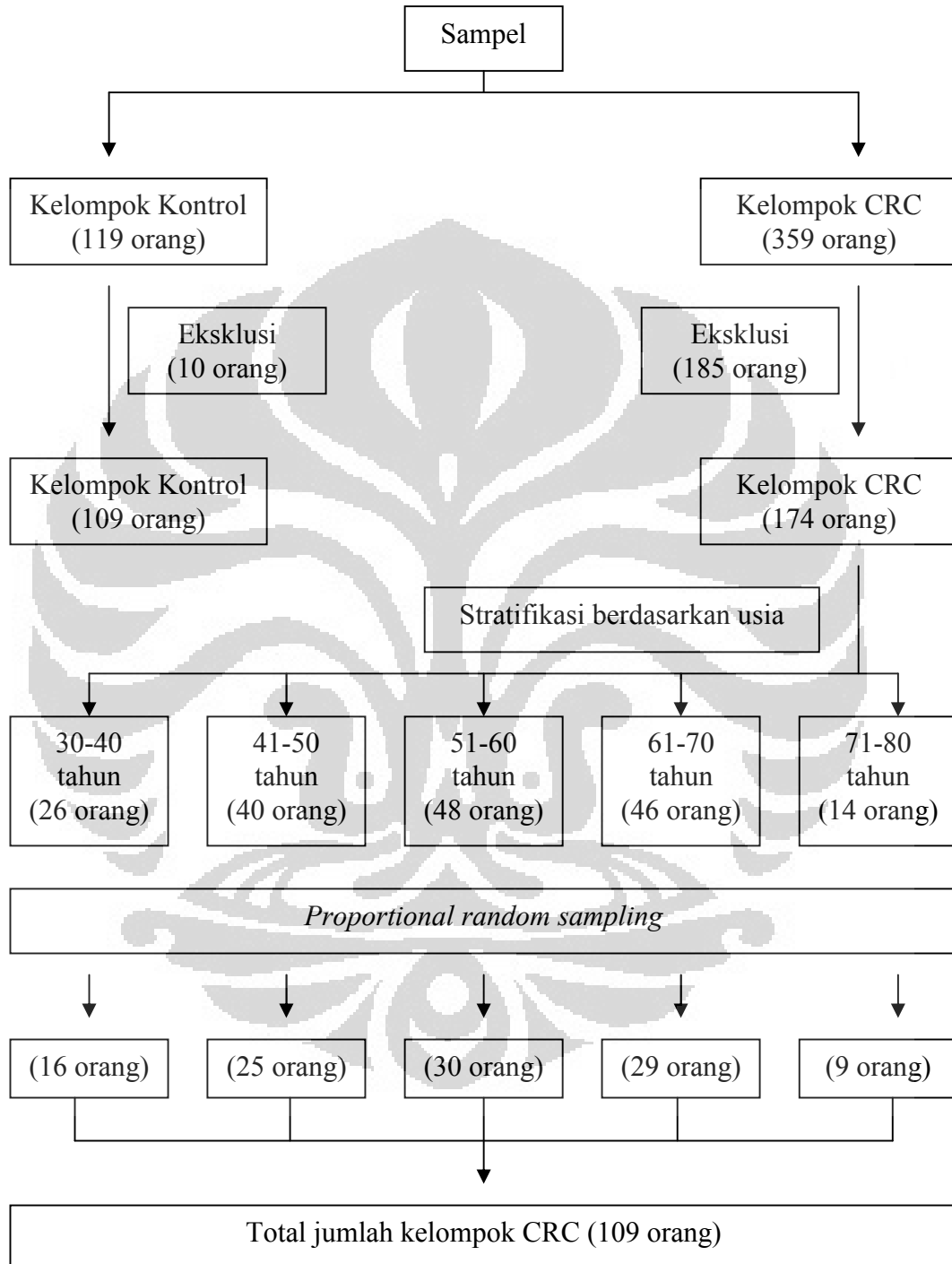
Lampiran 10. Desain primer

No.	Primer	Hairpin (ΔG) kcal/mol		Homo Dimer (ΔG) kcal/mol		Hetero dimer (ΔG) kcal/mol	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max
1	Primer F	1.04	0.24	2bp (-1.34)	3bp (-3.55)	2bp (-1.34)	3bp (-3.55)
	Primer R	0.98	0.23	2bp (-1.6)	2bp (-3.14)	2bp (-1.34)	3bp (-3.55)
2	Primer F	-1.7		2bp (-1.34)	3bp (-5.09)	2bp (-1.34)	4bp (-6.61)
	Primer R	1.14	0.23	2bp (-1.60)	2bp (-3.14)	2bp (-1.34)	4bp (-6.61)
3	Primer F	-1.7		2bp (-1.34)	3bp (-5.09)	2bp (-1.60)	3bp (-3.55)
	Primer R	1.14	0.23	2bp (-1.60)	2bp (-3.14)	2bp (-1.34)	3bp (-3.55)
4	Primer F	-1.7		2bp (-1.34)	3bp (-5.09)	2bp (-1.34)	3bp (-3.55)
	Primer R	1.14	0.23	2bp (-1.60)	2bp (-3.14)	2bp (-1.34)	3bp (-3.55)

Lampiran 11. Lembaran data oligonukleotida pada primer F dan R

Sequence	Mod	Len	Scale	Purity	Tm(°C)	GC(%)	MW	OD	µg	pmol	To make 100 µM
5'-CAC AGT CTG CTC TTT GAA GG-3'		20	50 nmole	PCR Grade	60.4	50.0	6108	6.4	210.6	34483	add 345µl of dH2O
5'-GGT TGA GGC TGG AAG TGA AG-3'		20	50 nmole	PCR Grade	62.4	55.0	6302	6.2	190.0	30156	add 302µl of dH2O

Lampiran 12. Alur proses pemilihan sampel pada kelompok kontrol dan kelompok CRC



Lampiran 13. Perhitungan jumlah sampel dalam masing-masing strata yang diambil secara proporsional

Pengambilan sampel secara proporsional menggunakan rumus:

$$X = \left(\frac{a}{n} \right) N \quad (1)$$

Ket:

a= jumlah sampel pada setiap strata usia

n= jumlah total keseluruhan sampel hasil inklusi

N= jumlah total sampel yang akan diikuti dalam penelitian

Jadi, masing-masing strata diperoleh jumlah sampel sebagai berikut:

a. Strata 30-40 tahun

$$X = \left(\frac{26}{174} \right) \times 109 = 16,3 \approx 16$$

b. Strata 41-50 tahun

$$X = \left(\frac{40}{174} \right) \times 109 = 25,1 \approx 25$$

c. Strata 51-60 tahun

$$X = \left(\frac{48}{174} \right) \times 109 = 30,1 \approx 30$$

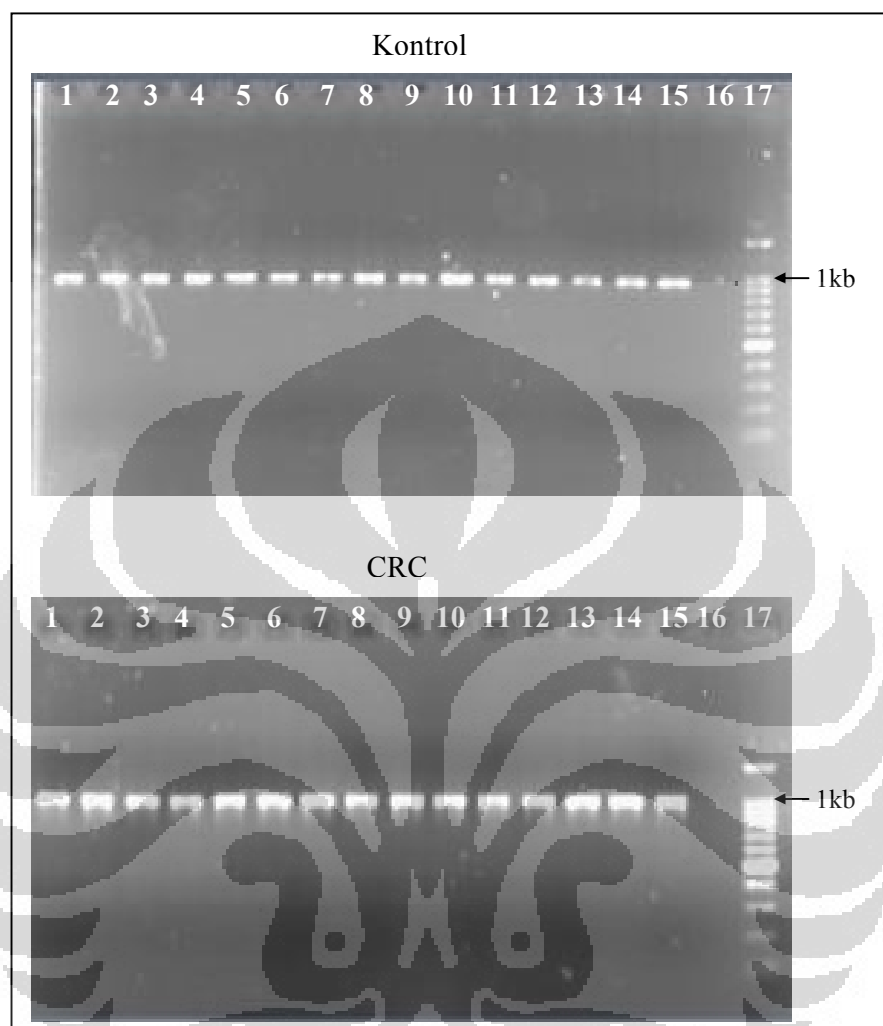
d. Strata 61-70 tahun

$$X = \left(\frac{46}{174} \right) \times 109 = 28,8 \approx 29$$

e. Strata 71-80 tahun

$$X = \left(\frac{14}{174} \right) \times 109 = 8,7 \approx 9$$

Lampiran 14. Elektroforesis gel hasil PCR pada kelompok Kontrol dan CRC



Ket: Urutan penomoran sampel

Kontrol : (1) C003; (2) C011; (3) C015; (4) C018; (5) C052; (6) C053; (7) C054; (8) C056; (9) C057; (10) C058; (11) C059; (12) C060; (13) C061; (14) C062; (15) Kontrol positif; (16) Kontrol negatif; (17) *Ladder (marker)*

CRC : (1) CRC 089; (2) CRC 093; (3) CRC 111; (4) CRC 115; (5) CRC 116; (6) CRC 118; (7) CRC 119; (8) CRC 121; (9) CRC 122; (10) CRC 140; (11) CRC 144; (12) CRC 148; (13) CRC 150; (14) CRC 152 ; (15) Kontrol positif; (16) Kontrol negatif; (17) *Ladder (marker)*

Lampiran 15. Elektroferogram hasil sekuensing pada tiga genotip

