Artikel Penelitian

Survival Pasien Kanker Kolorektal di RSUD Nganjuk dan Ekspresi Gen APC, KRAS dan SMAD4 Pada Tumornya

Pratika Yuhyi Hernanda,[*] Pramugyono,[**] Ida Septika Wulansari,[***] Harman Agusaputra,[***] Maria Wijayanti Sugeng,[*] Fuad Ama,[*] Nadia Fitri Shalsabilla[*]

**Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya*
***Spesialis Bedah Umum dan Onkologi, Rumah Sakit Umum Daerah Nganjuk, Surabaya*
****Spesialis Patologi Anatomi, Rumah Sakit Umum Daerah Nganjuk, Surabaya*

Abstrak

Pendahuluan: *Survival pasien kanker kolorektal sangat dipengaruhi oleh faktor penyertanya antara lain usia, merokok, obesitas faktor komorbid serta faktor genetiknya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisa faktor-faktor yang mempengaruhi survival kanker kolorektal di RSUD Nganjuk dan melihat ekspresi gen APC, KRAS dan SMAD4 pada jaringan tumornya.*
Metode: *Sebanyak 51 pasien kanker kolorektal kami analisa faktor-faktor penyertanya kemudian kami analisa hubungannya dengan survival kanker kolorektalnya. Pengecatan immunohistochemistry (IHC) dilakukan untuk melihat ekspresi gen KRAS, APC dan SMAD4 pada jaringan kanker kolorektal. Data dianalisis dengan analisa bivariat antar variabel menggunakan uji Chi Square dan analisa survival dilakukan dengan analisa statistik Kaplan Meier.*
Hasil: *Terlihat dari data bahwa pasien kanker kolorektal yang memiliki penyakit komorbid memiliki kecenderungan tingkat survival yang lebih rendah dibandingkan pasien yang tidak memiliki komorbid (P-value 0.054) dan pasien yang mengalami metastasis juga memiliki tingkat survival yang lebih rendah (P-value 0.748). Ekspresi gen APC dan SMAD4 pada IHC jaringan stroma lebih dominan daripada ekspresi gen KRAS pada stroma. Ekspresi gen yang meningkat pada stroma menandakan perannya pada invasi dan metastasis tumor.*
Kesimpulan: *Faktor penyakit komorbid dan adanya metastasis menunjukkan kecenderungan yang negatif pada survival pasien kanker kolorektal. Ekspresi gen APC dan SMAD4 pada jaringan stroma lebih dominan daripada ekspresi gen KRAS pada stroma, menunjukkan peran gen tersebut pada invasi dan metastasis tumor.*

Kata Kunci: *Kanker kolorektal, Survival, Gen.*

Korespondensi: **Pratika Yuhyi Hernanda**
E-mail*: yuhyi_h@yahoo.com*

Comorbid Factors, Metastasis and Their Relationship with Survival of Colorectal Cancer Patients at Nganjuk Regional Hospital and Their Relationship with APC, KRAS and SMAD4 Gene Expression in Cancer Tissue

Pratika Yuhyi Hernanda,[*] Pramugyono,[**] Ida Septika Wulansari,[***] Harman Agusaputra,[***] Maria Wijayanti Sugen,[*] Fuad Ama,[*] Nadia Fitri Shalsabilla[*]

**Faculty of Medicine, Wijaya Kusuma University, Surabaya*
***Specialist in General Surgery and Oncology, Nganjuk Regional General Hospital, Surabaya*
****Specialist in Anatomical Pathology, Nganjuk Regional General Hospital, Surabaya*

Abstract

Introduction: *The survival of colorectal cancer patients is significantly influenced by comorbid factors, including age, smoking, obesity, comorbidities, and genetics. The purpose of this study was to analyze factors affecting colorectal cancer survival in Nganjuk Regional General Hospital and to examine the expression of the APC, KRAS, and SMAD4 genes in tumor tissue.*
Methods: *We analyzed the comorbid factors in 51 colorectal cancer patients and then analyzed their relationship to colorectal cancer survival. Immunohistochemistry (IHC) staining was performed to examine the expression of the KRAS, APC, and SMAD4 genes in colorectal cancer tissue. Data were analyzed using bivariate analysis between variables using the Chi-square test, and survival analysis was performed using Kaplan-Meier statistical analysis.*
Results: *The data shows that colorectal cancer patients with comorbidities tend to have a lower survival rate than those without comorbidities (P-value 0.054), and patients with metastases also have a lower survival rate (P-value 0.748). APC and SMAD4 gene expression in stromal tissue IHC was more dominant than KRAS gene expression in the stroma. Increased gene expression in the stroma indicates its role in tumor invasion and metastasis.*
Conclusion: *Comorbidities and the presence of metastases negatively impact the survival rate of colorectal cancer patients. APC and SMAD4 gene expression in the stromal tissue was more dominant than KRAS gene expression in the stroma, suggesting a role for these genes in tumor invasion and metastasis.*

Keywords: *Colorectal cancer, Survival, Gene*

Pendahuluan

Kanker kolorektal adalah suatu tumor maligna yang muncul dari jaringan epitel dari kolon atau rektum. Di Indonesia, kanker kolorektal merupakan jenis kanker ketiga terbanyak. Kasus kanker kolorektal di Indonesia pada perempuan adalah terbanyak ketiga setelah kanker payudara dan kanker serviks. Sedangkan pada laki-laki, kanker kolorektal menempati urutan kedua setelah kanker paru, diikuti yang ketiga kanker prostat.[1]

Patofisiologi kanker kolorektal melibatkan sejumlah perubahan molekuler dan seluler kompleks yang terjadi selama bertahap dari pertumbuhan polip hingga menjadi kanker. Proses ini sering dimulai dengan pembentukan polip adenomatous, yang dapat mengalami transformasi menjadi kanker melalui serangkaian perubahan genetik. Mutasi pada gen tertentu, seperti gen *Adenomatous Polyposis Coli* (gen APC), gen *Kirsten Rat Sarcoma* (gen KRAS), dan gen p53, dapat memicu pertumbuhan sel yang tidak terkendali dan menghindari mekanisme kontrol normal yang mengatur proliferasi sel.[2,3]

Survival pasien kanker kolorektal merujuk pada lamanya waktu hidup seseorang setelah menerima diagnosis kanker pada usus besar atau rektum. Survival ini sering diukur dalam periode waktu tertentu setelah diagnosis, seperti tingkat kelangsungan hidup

lima tahun. Faktor-faktor yang mempengaruhi survival termasuk tahap kanker (stadium), jenis dan lokasi tumor, respons terhadap pengobatan, serta faktor-faktor lain seperti usia, kesehatan umum, dan adanya penyakit komorbid. Adapun ekspresi gen yang bermutasi belum sepenuhnya diketahui apakah berhubungan dengan survival pasien kanker kolorektal atau tidak.[4,5]

Faktor-faktor yang mempengaruhi survival kanker kolorektal diantaranya adalah stadium kanker, jenis dan lokasi tumor, respons terhadap pengobatan, serta faktor-faktor lain seperti usia, kesehatan umum, dan adanya penyakit komorbid. Namun bagaimana mekanisme didalam sel terkait mutasi gen yang terjadi dan pengaruhnya terhadap survival pasien belum sepenuhnya diketahui. Oleh karena itu, peneliti ingin menganalisa lebih jauh hubungan antara ekspresi gen yang bermutasi tersebut, diantaranya gen KRAS, APC dan SMAD4 dengan survival pada pasien kanker kolorektal. Analisa ekspresi gen ini dilakukan dengan melihat hasil pengecatan immunohistokimia untuk gen-gen tersebut diatas pada jaringan tumor pasien kanker kolorektal yang sudah dihilangkan parafinnya untuk kemudian dilakukan analisa statistik untuk dihubungkan dengan data survival pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk dan RSUD RT Notopuro.

Metode

Setelah mendapatkan persetujuan etik dari RSUD Nganjuk dan RSUD RT Notopuro, pengambilan data sekunder dilakukan dengan menelusuri data rekam medis pasien serta pengumpulan bahan blok paraffin jaringan tumor kanker kolorektal pasien. Data survival analisis diambil dari data tanggal pertama kali didiagnosis kanker kolorektal dan tanggal terakhir kunjungan /kematian.

Pengecatan *Immunohistochemistry* (IHC) pada jaringan kanker kolorektal dilakukan pada jaringan kanker kolorektal yang tertanam parafin pada slide TMA, untuk kemudian dideparafinasi dalam xylene, direhidrasi dalam alkohol bertingkat. Untuk pengambilan antigen, slide direbus dalam Tris/EDTA pH 9,0 selama 30 menit (untuk antibodi SMAD4) dan 10 menit untuk antibodi lain; 3% H2O2 digunakan untuk memblokir peroksidase endogen selama 10 menit pada suhu kamar. Slide diinkubasi dalam milk blocking solution 5% diikuti dengan inkubasi semalaman dalam antibodi SMAD4 tikus (pengenceran 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,Huissen, Belanda), serta antibodi KRAS dan APC (pengenceran 1:250, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), dan kemudian melakukan counterstained dengan hematoksilin. Penilaian SMAD4 didasarkan pada pewarnaan nukleus dan penilaian KRAS dan APC didasarkan pada sitoplasma dan/atau pewarnaan inti.

Untuk pewarnaan KRAS spesifiknya adalah sebagai berikut: Blok jaringan FPPE diwarnai dengan pewarnaan tes imunohistokimia. Bagian FPPE blok jaringan (4 μm) ditransfer ke positif slide bermuatan. Kemudian, mereka menjadi sasaran deparaffinisasi, rehidrasi, dan pemblokiran dengan hidrogen peroksida dan pengambilan antigen (target Dako pengambilan larutan, buffer sitrat pH 6,0) pada 100 0C untuk 10 menit. Setelah dibilas sebentar dengan buffer fosfat saline (PBS), slide kemudian diinkubasi semalaman pada suhu kamar dengan antibodi primer melawan Onkoprotein KRAS (orb53139 poliklonal KRAS antibodi: pengenceran 1:100, UK). Slide dicuci dengan PBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit dengan diberi label antibodi sekunder. Visualisasi produk (Dako) dilakukan dengan substrat diaminobenzidine sebagai kromogen tersebut. Slide- slide tersebut diimbangi dengan pewarnaan Hematoksilin Mayer dan dicuci masing-masing satu kali air suling dan PBS. Akhirnya, slide mengalami dehidrasi dengan etanol, dibersihkan dalam xilena, dan dipasang di bawah cover slide.[6,7]

Analisis survival dilakukan dengan uji survival Kaplan-Meier pada aplikasi SPSS untuk mengetahui hubungan variabel data dengan tingkat survival pada pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk. Kemudian dilakukan analisa hubungan dengan statistic non parametrik *Chi Square* untuk menilai ada tidaknya hubungan ekspresi gen dengan hasil penilaian survival analisis pada pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk.

Hasil

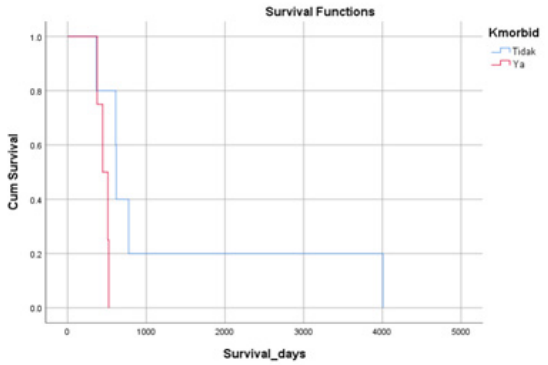
Pasien kanker kolorektal yang berobat ke RSUD Nganjuk berjumlah 81 pasien. Dari jumlah tersebut, hanya 51 pasien yang dapat diakses rekam medisnya. Data diperoleh dengan mengumpulkan informasi rekam medis terkait nama, tanggal lahir, tanggal pertama kali diagnosa, tanggal last follow up dan tanggal kematian jika ada. Faktor-faktor risiko dari kanker kolorektal juga ditelusuri diantaranya faktor komorbid dan faktor sosioekonomi. Selain itu, karakteristik tumor juga kami telusuri datanya sehingga analisa survival kanker kolorektal dapat lebih komprehensif. Data kami sajikan dalam bentuk tabel dan kami analisa sesuai dengan variabel yang ada.

Sebanyak 51 pasien kanker kolorektal telah kami analisa data rekam medisnya dengan data karakteristik pada Tabel 1. Oleh karena keterbatasan blok parafin yang dimiliki oleh RSUD Nganjuk, maka kami dapatkan sebanyak 8 spesimen blok parafin dari bagian Patologi Anatomi RSUD Nganjuk. Dari 8 sampel blok parafin yang ada, telah dilakukan proses awal immunohistochemistry untuk mengetahui ekspresi gen KRAS, APC dan SMAD 4 pada jaringan kanker pasien kolorektal. Berikut adalah data dan hasil analisa dari 51 pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk diantaranya data karakteristik pasien, data komorbid dan data faktor risiko serta sosio ekonomi pasien.

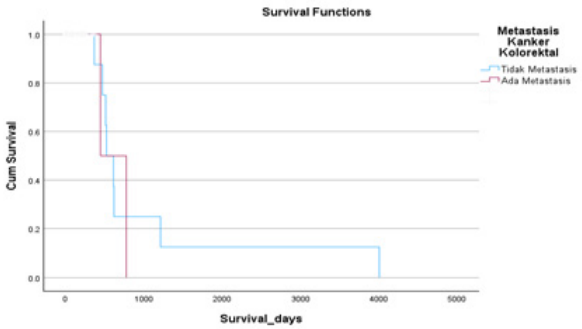
Tabel 1. Data Karakteristik Pasien Kanker Kolorektal

Karakteristik	Frekuensi	Persentase
Usia > 50 thn	29	56.9%
Jenis kelamin Laki2	29	56.9%
Sudah Menikah	39	76.5%
Bekerja	21	41.2%
Pendidikan SLTA ke atas	9	17.6%
Merokok	0	0%
Obesitas	0	0%
Alkohol	0	0%
Penyakit Komorbid	18	35.3%
Metastasis	21	41.2%
Survival > 1 Tahun	11	21.6%
Total	51	100%

Dari data karakteristik pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk, terlihat bahwa mayoritas pasien kanker kolorektal adalah berusia lebih dari 50 tahun, berjenis kelamin laki-laki dan berpendidikan SLTA kebawah. Semua pasien kanker kolorektal dalam populasi penelitian tidak memiliki riwayat merokok, obesitas maupun riwayat konsumsi alkohol. Tidak ada hubungan antara usia, jenis kelamin, status marital, pendidikan, merokok, obesitas, alkohol, penyakit komorbid dan metastasis dengan survival kanker kolorektal (*p value* > 0.05). Namun ada kecenderungan dari gambar tingkat survival (Gambar 1 dan 2), pasien kanker kolorektal yang memiliki penyakit komorbid memiliki tingkat survival yang lebih rendah dibandingkan pasien yang tidak memiliki komorbid (*P-value* 0.054) dan pasien yang mengalami metastasis juga memiliki tingkat survival yang lebih rendah (*P-value* 0.748) dibandingkan pasien yang tidak mengalami metastasis.



Gambar 1. Analisa Hubungan Faktor Komorbid dengan Survival Pasien Kanker Kolorektal



Gambar 2. Analisa Hubungan Adanya Metastasis dengan Survival Pasien Kanker Kolorektal

Semua pasien kanker kolorektal dalam populasi penelitian tidak memiliki riwayat merokok, obesitas maupun riwayat konsumsi alkohol.

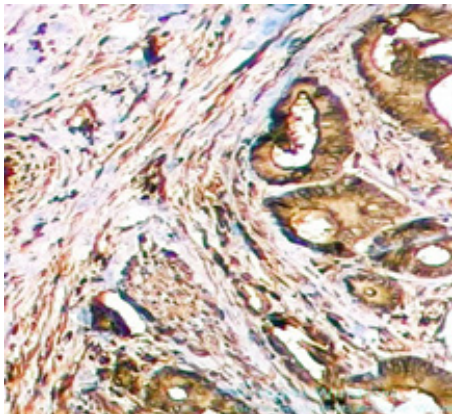
Diskusi

Pasien yang memiliki penyakit komorbid dan metastasis cenderung mempunyai tingkat survival yang lebih rendah, namun tidak terdapat hubungan signifikan antara penyakit komorbid dengan survival pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk.

Mutasi pada gen tertentu, seperti APC, KRAS, dan p53, dapat memicu pertumbuhan sel yang tidak terkendali dan menghindari mekanisme kontrol normal yang mengatur proliferasi sel. Peneliti ingin menganalisa lebih jauh adakah hubungan antara ekspresi gen yang bermutasi tersebut, diantaranya gen KRAS, APC dan SMAD4 dengan survival pada pasien kanker kolorektal.

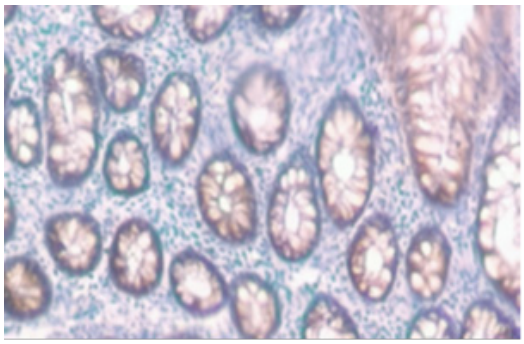
Analisa ekspresi gen ini dilakukan dengan melihat hasil pengecatan immunohistokimia untuk gen-gen tersebut diatas pada jaringan tumor pasien kanker kolorektal yang

sudah diparafinisasi untuk kemudian dilakukan analisa statistik untuk dihubungkan dengan data survival pasien kanker kolorektal di RSUD Nganjuk. Berikut hasil analisa awal ekspresi gen KRAS, APC dan SMAD4 pada jaringan kanker kolorektal pasien RSUD Nganjuk.



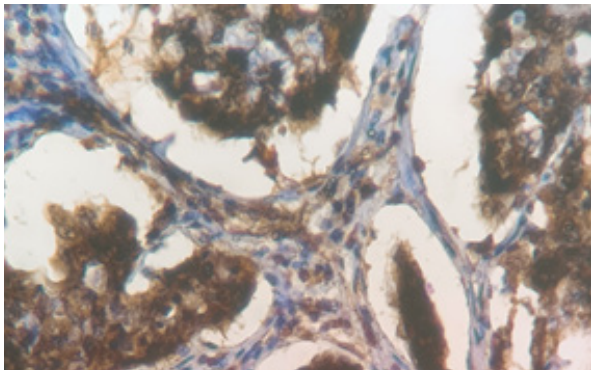
Gambar 3. Ekspresi gen APC pada Jaringan Kanker Kolorektal dan Lingkungan Mikro Disekitarnya (stroma)

Ekspresi gen APC pada jaringan kanker kolorektal terlihat lebih tinggi pada jaringan epitel kanker daripada di jaringan stromanya. APC tergolong gen penekan tumor. Gen penekan tumor mencegah pertumbuhan sel yang tidak terkendali yang dapat mengakibatkan tumor kanker. Protein yang dibuat oleh gen APC memainkan peran penting dalam beberapa proses seluler yang menentukan apakah suatu sel dapat berkembang menjadi tumor. Pada intinya, gen APC menangkal proliferasi, mendorong diferensiasi, memfasilitasi apoptosis, dan menekan invasi dan perkembangan tumor.[8] Ekspresi gen yang tinggi pada jaringan stroma menandakan peran gen tersebut dalam proses invasi dan perkembangan tumor, dalah hal ini oleh karena pada kanker kolorektal terjadi mutasi gen APC, maka fungsi gen APC sebagai penekan tumor dapat berubah fungsi sebaliknya. Mutasi biallelik gen APC terjadi pada 45%–80% kanker kolorektal. Mutasi pada APC sering kali berupa pergeseran kerangka, penyisipan atau penghapusan yang memperkenalkan kodon stop prematur dan menyebabkan produksi protein APC terpotong yang tidak memiliki fungsi normalnya dan memiliki sifat tumorigenik. Status mutasi APC memiliki nilai sebagai penanda prediktif prognosis yang buruk pada kanker kolorektal terutama Stadium III, yang memunculkan kemungkinan bahwa mutasi APC tidak hanya memicu perkembangan kanker kolorektal, tetapi juga mendorong fenotipe klinis yang relevan dengan perkembangan dan metastasis.[9]



Gambar 4. Ekspresi gen KRAS Pada Jaringan Kanker Kolorektal dan Lingkungan Mikro Disekitarnya (stroma)

Ekspresi gen KRAS pada jaringan kanker kolorektal terlihat mendominasi pada jaringan epitel dibandingkan jaringan stromanya yang hampir tidak terlihat ekspresinya. KRAS (kirsten rat sarcoma viral oncogene) adalah gen yang berperan dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel. Mutasi gen KRAS dapat menyebabkan protein KRAS terjebak dalam posisi "aktif" sehingga sel tumbuh tak terkendali. Hal ini dapat menyebabkan perbanyakan sel dan pertumbuhan kanker. Eskpresi gen KRAS yang positif pada jaringan epitel kanker kolorektal yang disertai dengan tingginya ekspresi APC dapat meningkatkan kemungkinan metastasi pada kanker kolorektal.[8]



Gambar 5. Ekspresi gen SMAD4 Pada Jaringan Kanker Kolorektal dan Lingkungan Mikro Disekitarnya (stroma)

Ekspresi gen SMAD4 pada jaringan kanker kolorektal terlihat jauh lebih tinggi dibandingkan ekspresinya pada sel-sel stroma disekitarnya. Untuk SMAD4, hal ini sedikit berbeda pada jaringan kanker liver dimana

stroma pada kanker liver mengekspresikan gen SMAD4 lebih banyak.[6] Seperti yang telah disebutkan dalam literatur sebelumnya bahwa gen SMAD4 memiliki potensi non kanonik untuk mempercepat pertumbuhan tumor dimana peningkatan drastis nuclear SMAD4 pada sub-populasi tumor HCC menyoroti potensinya sebagai prediktor keberhasilan terapi dan survival pada pasien dan target untuk pengembangan terapi target.[6]

Kesimpulan

Faktor penyakit komorbid dan metastasis menunjukkan kecenderungan yang negatif dengan survival pasien kanker kolorektal. Ekspresi gen APC dan SMAD4 pada jaringan stroma lebih dominan daripada ekspresi gen KRAS pada stroma, menunjukkan peran gen tersebut pada invasi dan metastasis tumor kolorektal.

Daftar Pustaka

1. Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. CA: a cancer journal for clinicians. 2019 May;69(3):184-210.
2. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. Digestive diseases and sciences. 2015 Mar;60(3):762-72.
3. Imyanitov E, Kuligina E. Molecular testing for colorectal cancer: Clinical applications. World Journal of Gastrointestinal Oncology. 2021 Oct 15;13(10):1288.
4. Wulandari M, Siregar Y, Muchtar N. Genetic mutation profile and clinical implications in colorectal cancer patients in Indonesia. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(2):439-45.
5. Murni, A. R. Colorectal cancer and its correlation with inflammation in the Indonesian population. Annals of Medicine and Surgery. 2020;59:108-13.
6. Hernanda PY, Chen K, Das AM, Sideras K, Wang W, Li J, et al. SMAD4 exerts a tumor-promoting role in hepatocellular carcinoma. Oncogene. 2015 Sep;34(39):5055-68.
7. Novrial D, Wijayana KA, Cahyani HK. Immunohistochemistry of KRAS protein in colorectal cancer. InProceedings: 1st Jenderal Soedirman International Medical Conference in conjunction with the 5th Annual Scientific Meeting (Temilnas) Consortium of Biomedical Science Indonesia 2021 (pp. 47-51).
8. Hankey W, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. Cancer and Metastasis Reviews. 2018 Mar;37(1):159-72.
9. Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, et al. Combined mutation of Apc, Kras, and Tgfbr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer. Cancer research. 2018 Mar 1;78(5):1334-46.