

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon

2.1.1 Epidemiologi

Insidensi kanker kolon di seluruh dunia paling banyak terdiagnosis ketiga pada jenis kelamin pria dan terbanyak kedua pada jenis kelamin wanita sebanyak 1.233.700 jiwa, dengan angka kematian sebanyak 608.700 jiwa pada tahun 2008. Jumlah kasus baru kanker kolon terbanyak ketiga setelah keganasan prostat dan paru pada pria dan terbanyak ketiga setelah keganasan payudara dan paru pada wanita, sejumlah 10% dari seluruh kasus keganasan baru di Amerika. Sebanyak 52.857 jiwa atau sekitar 10% dari seluruh kasus keganasan per tahun berakhir dengan kematian akibat kanker kolon. Insidensi kanker kolon lebih rendah pada negara berkembang dibandingkan dengan negara maju. Perbedaan ini sangat berhubungan dengan perbedaan diet yang dikonsumsi penduduk yaitu lemak, daging, dan serat. Di kawasan Asia tenggara insidensi kanker kolorektal menduduki peringkat ke-10.^{1,18,19} Di Indonesia terdapat kenaikan jumlah kasus dari berbagai laporan tetapi belum ada angka yang pasti. Data yang diambil dari Departemen Kesehatan RI didapatkan angka insidensi 1,8 per 100.000 penduduk.²⁰ Kanker kolorektal menempati peringkat kedua dari seluruh kanker terbanyak pada pria setelah kanker paru, sedangkan pada wanita merupakan nomor tiga setelah kanker serviks dan payudara di kota Semarang.⁴

Kanker kolon banyak terjadi di wilayah benua Eropa, Amerika Utara, Australia, dan New Zealand. Sedangkan di benua Afrika, Asia, dan beberapa Negara di benua Amerika Selatan cenderung lebih rendah. Peningkatan insidensi pada wilayah resiko rendah seperti di Jepang dan beberapa Negara Asia Timur dikarenakan kombinasi faktor perubahan pola diet, obesitas dan merokok. Kanker kolon biasanya lebih sering terjadi pada pria daripada wanita. Terdapat bukti klinis peningkatan penderita kanker kolon meningkat pada populasi pemuda negro. Rata-rata usia penderita kanker kolon 62 tahun. Kasus yang terjadi pada lansia biasanya berupa tipe medular.^{18,21}

2.1.2 Anatomi dan Histologi

Usus besar dimulai dari kuadran kanan bawah abdomen yang dinamakan caecum, berlanjut ke kranial sebagai kolon ascendens, fleksura hepatica, kolon transversum, fleksura lienalis, kolon descendens, kolon sigmoid, dan rektum. Kolon diperkirakan memiliki panjang 150 cm, dengan diameter mengecil secara bertahap mulai caecum sampai *rectosigmoid junction* dan terdapat pelebaran kembali pada ampula rektum. Kolon berbeda dari usus kecil karena memiliki karakteristik tertentu seperti *haustra*, *taenia*, dan *apendiks epiploica*. Rektum dimulai dari promontorium turun sepanjang kurvatura sacrum dan coccyx dan berakhir setelah melewati otot levator ani, yang kemudian berlanjut sebagai canalis analis.³³

Vaskularisasi kolon dan rektum disuplai oleh a. mesenterika superior dan a. mesenterika inferior cabang dari aorta abdominalis. Pada rektum vaskularisasi

mendapat anastomosis dari a. iliaca interna melalui a. rectalis media dan inferior. Drainase vena terutama dialirkan menuju vena mesenterika superior dan inferior. Vena mesenterika inferior mengalirkan darah ke vena lienalis dan akan bergabung dengan vena mesenterika superior menjadi vena porta. Aliran limfe dimulai dari folikel dan pembuluh limfe pada bagian bawah lamina propria sepanjang muskularis mukosa, yang menjadi berlipat pada submukosa dan lapisan otot. Pembuluh ini terhubung ke limfatik ektramural kemudian menuju limfonodi epicolica, paracolica, intermediate, dan principal. Inervasi kolon dan rektum terdiri dari serabut simpatis yang berasal dari medulla spinalis segmen bawah thorakalis dan segmen atas lumbalis, sedangkan serabut parasimpatis berasal dari vagus dan pleksus sacralis.²²

Secara umum struktur traktus digestivus memiliki karakteristik tertentu yaitu tabung berongga dengan ukuran lumen bervariasi, memiliki dinding yang terdiri dari empat lapisan yaitu mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Mukosa terdiri dari lapisan epitel dengan dasar berupa lamina propria yang terdiri dari jaringan ikat longgar yang kaya akan pembuluh darah, limfe, dan sel otot polos. Pada submukosa terdapat pembuluh darah dan limfe, serta anyaman saraf autonom. Lapisan muskularis terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan otot sirkular dan lapisan otot longitudinal. Diantara kedua lapisan otot tersebut terdapat pula anyaman saraf myenterikus, yang bersama dengan anyaman saraf submukosa membentuk sistem saraf enterik lokal. Lapisan serosa merupakan jaringan ikat longgar yang kaya struktur pembuluh darah, limfe dan jaringan lemak, dilapisi

oleh mesotelium. Lapisan serosa ini berlanjut menjadi mesokolon sebagai penggantung organ intraperitoneal.²³

Mukosa usus besar tidak memiliki vili maupun plika kecuali pada bagian rektum. Lekukan mukosa dapat masuk sampai muara kelenjar tubular intestinal yang berdampingan dengan sel goblet, sel absorpsi, dan sejumlah kecil sel enteroendokrin. Sel kelenjar tubular intestinal ini dapat berkembang menjadi sel ganas sebagai adenokarsinoma sekitar 90-95%. Sel absorpsi atau kolonosit memiliki bentuk kolumnar dan mikrovili yang pendek dan irregular. Lamina propria kaya akan sel limfoid dan nodul limfoid yang sering penetrasi ke submukosa.²³

2.1.3 Etiologi dan Patogenesis

Karsinogenesis kolon merupakan proses kompleks dan bertahap dimana berbagai macam perubahan mempengaruhi transformasi sel normal menjadi sel ganas. Beberapa kategori gen yang terlibat yang secara normal teregulasi yang berperan dalam menjaga keseimbangan antara pertumbuhan sel, kematian sel, replikasi DNA, dan mekanisme *repair*. Gangguan keseimbangan antara onkogen yang memacu proliferasi sel dan *tumor suppressor gen* yang menghambat pertumbuhan berlebihan menghasilkan ekspansi sel ganas.

Mutasi DNA dapat terjadi baik secara mutasi somatik yang terjadi saat sel tumbuh dan berkembang, dalam menjaga keseimbangan jaringan, atau mutasi *germ-line* yang ditransmisikan secara herediter. Pada sel yang berfungsi secara normal, dapat memiliki kecenderungan mutasi genetik spontan yang dapat

dideteksi kerusakannya oleh sel tersebut dan melakukan mekanisme *repair* yang efektif. Akan tetapi, bila kerusakan sel terlalu berat akan terjadi mekanisme apoptosis. Ketika sel gagal mengenali kerusakan DNA dan gagal memperbaikinya, akan terjadi akumulasi produk gen yang cacat, bahkan akan memicu respon proliferasi. Jika hasil replikasi tersebut meningkatkan potensi pertumbuhan sel normal sekitarnya akan menyebabkan keadaan instabilitas genetik dan memicu berkembangnya sel ganas.²⁴

Terdapat 2 tipe instabilitas genetik : ^{24,25}

1. Instabilitas Kromosom (CIN)

Pada keadaan ini terjadi hilangnya kromosom akibat pembelahan kromosom yang tidak simetris saat mitosis sehingga salah satu sel yang terbentuk tidak menerima salinan kromosom. Keadaan ini disebut *loss of Heterozygosity* (LOH) dan berhubungan dengan prognosis buruk.

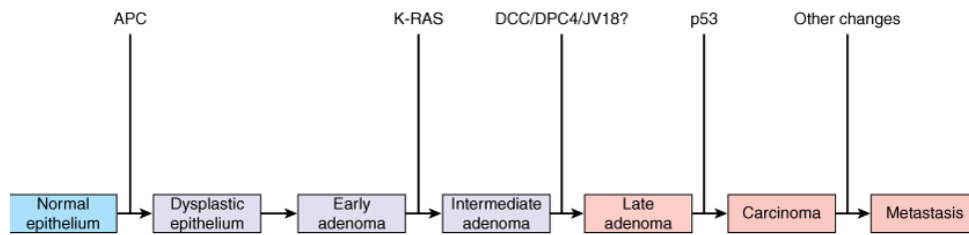
2. *Microsatellite Instability* (MSI)

Terjadinya kesalahan replikasi pada tingkat DNA yang menyebabkan penambahan untaian DNA. Keadaan ini dapat ditemukan pada *Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer* (HNPCCs)

Selama proses pembelahan sel, DNA diduplikasi dimana DNA asli berperan menyediakan pola untuk salinan replikasi. *DNA polymerase* berperan sebagai “*proofreader*” yang dapat mengenali bila terjadi kesalahan duplikasi, menunda sintesis DNA, membuang sekuens yang rusak dan mengulang sintesis DNA. Kegagalan peran ini menyebabkan berkembangnya mutasi sel yang terbentuk.

Enzim yang mengawasi DNA baru yang terbentuk dan mengoreksi kesalahan replikasi dinamakan *DNA mismatch repair (MMR) system*.²⁴

Model genetik tumorigenesis kolorektal ini pertama kali diperkenalkan oleh Vogelstein dkk pada tahun 1988 yang dikenal sebagai *adenoma-carcinoma sequens*. Model ini menggambarkan karsinogenesis sebagai akumulasi kejadian genetik, pertumbuhan dan proliferasi sel yang tidak terkendali. Mutasi gen dan hilangnya gen/kromosom yang diamati pada kanker kolon sporadik meliputi gen APC (adenoma-poliposis coli), gen MMC (mutasi pada kanker kolon), *K-ras*, DCC (*Deleted in Colon Cancer*), dan gen p53. Mutasi gen APC yang berperan dalam mengontrol adhesi antar sel dan komunikasi interseluler ditemukan sebanyak 60%, dan merupakan kejadian pertama kali dalam karsinogenesis. Mutasi *K-ras* yang secara normal berfungsi sebagai transduksi sinyal intraseluler dan stimulasi pembelahan sel, terjadi pada adenoma dan karsinoma yang lebih besar dan juga menstimulasi pertumbuhan sel. Penghapusan gen tumor supresor DCC menyebabkan progresi dari polip jinak menjadi ganas. Mutasi gen p53, dimana merupakan gen yang paling banyak terjadi mutasi pada kanker manusia, juga terjadi pada kanker kolon invasif, yang menunjukkan bahwa mutasi gen p53 terjadi pada akhir perkembangan fenotip invasif. Penting diketahui bahwa tidak ada kejadian tunggal yang terjadi pada perkembangan kanker kolon berdasarkan bukti laporan peningkatan jumlah gangguan genetik pada kasus tersebut.^{24,25}



Gambar 1. Gambar skematik kejadian morfologi dan molekuler tumorigenesis kolorektal.²⁶

2.1.4 Klasifikasi

Secara mikroskopis, tumor ganas yang sering ditemukan pada kolon berupa adenokarsinoma differensiasi baik sampai sedang yang mensekresikan mucin dengan jumlah yang bervariasi. Kejadian tersebut disebabkan tumor sel mewakili kombinasi sel kolumnar dan sel goblet, kadang disertai dengan sel neuroendokrin. Permukaan tumor dapat memiliki konfigurasi papiller maupun villous. Tumor dapat terlihat menginvasi seluruh lapisan dinding kolon dan meluas sampai lemak pericola, spatium perineural, dan menginvasi vena. Residual polip dan fokus polip dapat terlihat pada tepi tumor, dimana hal tersebut paling banyak terdapat pada lokasi perubahan hiperplastik kelenjar, dengan bentuk lebih tinggi, lebih berlekuk, dan lebih banyak sel goblet dibanding mukosa normal.²⁶

Klasifikasi histopatologis berdasarkan WHO :²⁷

1. Adenokarsinoma musinous
2. Karsinoma sel signet ring
3. Karsinoma *small cell*
4. Karsinoma *medullary*
5. Karsinoma anaplastik / *undifferentiated*

6. Karsinoma adenoskuamosa / skuamosa

Berdasarkan gambaran gejala klinik, klasifikasi stadium ditentukan dengan sistem TNM : ^{27,28,29}

T = Tumor Primer

- Tx = Tumor primer tak dapat diperiksa
- T0 = Tidak terdapat tumor primer
- Tis = Karsinoma in situ; intraepithelial atau invasi lamina propria
- T1 = Tumor menginvasi submukosa
- T2 = Tumor menginvasi muskularis propria
- T3 = Tumor menginvasi seluruh muskularis propria sampai subserosa, atau jaringan perikolika atau perirektal nonperitoneal
- T4a = Tumor menembus permukaan peritoneum visceral
- T4b = Tumor menginvasi atau menempel pada organ atau struktur lain

N = Limfonodi Regional

- Nx = Limfonodi Regional tak dapat diperiksa
- N0 = Tak ada metastasis di Limfonodi Regional
- N1 = Metastasis pada 1-3 limfonodi regional
- N1a = Metastasis pada 1 limfonodi regional
- N1b = Metastasis pada 2-3 limfonodi regional
- N1c = Tumor deposit pada subserosa, mesenterium, atau jaringan perikolika nonperitoneal, atau jaringan perirektal tanpa metastasis limfonodi regional
- N2 = Metastasis pada 4 atau lebih limfonodi regional
- N2a = Metastasis pada 4-6 limfonodi regional
- N2b = Metastasis pada tujuh atau lebih limfonodi regional

M = Metastasis jauh

- M0 = Tak ada metastasis jauh
- M1 = Metastasis Jauh
- M1a = Metastasis meliputi organ tunggal
- M1b = Metastasis meliputi lebih dari satu organ atau peritoneum

R = Residual Tumor

- R0 = Reseksi komplit, margin negatif secara histologi, tidak ada residu tumor setelah reseksi
- R1 = Reseksi inkomplit, margin terlibat secara histologi, tumor tertinggal secara mikroskopis setelah reseksi
- R2 = Reseksi inkomplit, margin terlibat atau tumor tertinggal secara makroskopis setelah reseksi

Stadium Kanker Kolon :

Stadium 0	=	Tis	N0	M0
Stadium I	=	T1	N0	M0
		T2	N0	M0
Stadium IIA	=	T3	N0	M0
Stadium IIB	=	T4a	N0	M0
Stadium IIC	=	T4b	N0	M0
Stadium IIIA	=	T1-T2	N1/N1c	M0
		T1	N2a	M0
Stadium IIIB	=	T3-T4a	N1/N1c	M0
		T2-T3	N2a	M0
		T1-T2	N2b	M0
Stadium IIIC	=	T4a	N2a	M0
		T3-T4a	N2b	M0
		T4b	N1-N2	M0
Stadium IVA	=	Setiap T	Setiap N	M1a
Stadium IVB	=	Setiap T	Setiap N	M1b

2.1.5 Penatalaksanaan

Pembedahan tetap merupakan pilihan utama pada penatalaksanaan kanker kolorektal yang terlokalisir. Pembedahan pada kanker kolon dilakukan seradikal mungkin dengan pertimbangan preservasi organ sekitar, sedangkan pada tumor rektum penggunaan teknik *total mesorectal excision* (TME) dapat mengurangi rekurensi lokal dan memperbaiki angka *survival*. Pada penyakit stadium lanjut reseksi merupakan pilihan yang terbaik. Terapi *adjuvant* dapat berupa radiasi terutama pada kanker rektum karena pertimbangan preservasi organ atau fungsi. Radiasi pada kanker rektum sebaiknya diberikan pada kasus yang resektabel maupun yang tidak resektabel.³⁰

Pasien dengan karsinoma rektum stadium II-III berisiko tinggi untuk mengalami kekambuhan lokal dan sistemik. Terapi adjuvan harus bertujuan menanggulangi kedua masalah tersebut.³⁰

5FU diperkenalkan pertama kali pada tahun 1957 dimana telah terbukti dapat meningkatkan angka respon sebesar 20%. Penelitian meta-analisis skala besar percobaan klinis fase III membandingkan pembedahan saja dengan penambahan kemoterapi *adjuvant* 5FU meningkatkan angka *survival* sebesar 2,3-5,7%. Perkembangan selanjutnya kemoterapi ini diberikan kombinasi leucovorin yang dapat memodulasi aktivitas 5FU dan menurunkan toksisitasnya.³¹

Kanker kolon stadium III sebaiknya diberikan *adjuvant* kemoterapi terutama pada bentuk resiko tinggi. Terdapat bukti pada penelitian sebelumnya bahwa pada pasien dengan stadium II nodus negatif memberi keuntungan yang sama dibanding pasien stadium III nodus positif dalam hal pemberian kemoterapi *adjuvant*. Sejumlah percobaan klinis acak prospektif membuktikan keuntungan pemberian kemoterapi untuk kanker kolon stadium III resektabel. *Guidelines* saat ini merekomendasikan pemberian kemoterapi 5FU–Leucovorin dan regimen basis oxaliplatin sebagai standar terapi *adjuvant*.³²

2.1.6 Prognosis

Klasifikasi Dukes paling banyak dipakai, akan tetapi klasifikasi TNM memberi gambaran patologis yang lebih mendetail. *Surveillans* pasien kanker kolon berusia lebih dari 50 tahun meningkat dalam 25 tahun terakhir dikarenakan tes skrining seperti pemeriksaan *fecal occult blood* periodik, sigmoidoskopi, dan kolonoskopi dan *follow up* lebih teratur. Meningkatnya pengetahuan tentang genetika kanker kolon menambah pemeriksaan yang lebih tepat dan sangat membantu mendeteksi kanker kolon lebih dini di masa depan. Tabel di bawah

membandingkan angka *5-year survival rates* antara klasifikasi Dukes dengan sistem TNM.^{33,34}

Tabel 1. Perbandingan *5-year survival rates* antara klasifikasi *Dukes*, *staging* dan sistem TNM

TABLE 8.15. Staging of Colorectal Cancer and Survival Rates According to Dukes' Classification and TNM Stage			
<i>Dukes' Classification</i>	<i>Stage</i>	<i>TNM Classification</i>	<i>5-Year Survival</i>
A	I	T1 or T2, N0, M0	90%
B	II	T3 or T4, N0, M0	60%–80%
C	III	Any T, N1, N2, or N3, M0	20%–50%
D	IV	Any T, Any N, M1	5%

Prognosis lebih ditentukan oleh :³³

1. Diferensiasi histologi yang rendah dan adanya invasi vaskular dan perineural.
2. Adanya obstruksi atau perforasi
3. Sel tumor aneuploid
4. Tumor sel signet (musin intrasitoplasmik) dan tumor *mucin-producing*.
5. Meningkatnya kadar CEA

Pada pasien dengan kanker kolon, terdapat bukti bahwa pada pengecatan sederhana potongan tumor adanya infiltrasi limfosit dalam tumor berhubungan dengan peningkatan *survival*. Dengan adanya teknik pengecatan imunohistokimia semakin membuktikan bahwa peningkatan infiltrasi limfosit T CD4+ dan CD8+ berhubungan dengan peningkatan *survival* pasien dengan kanker kolon.^{34,35}

2.2. Pembelahan Mitosis dan Ki-67 *Labelling Index*

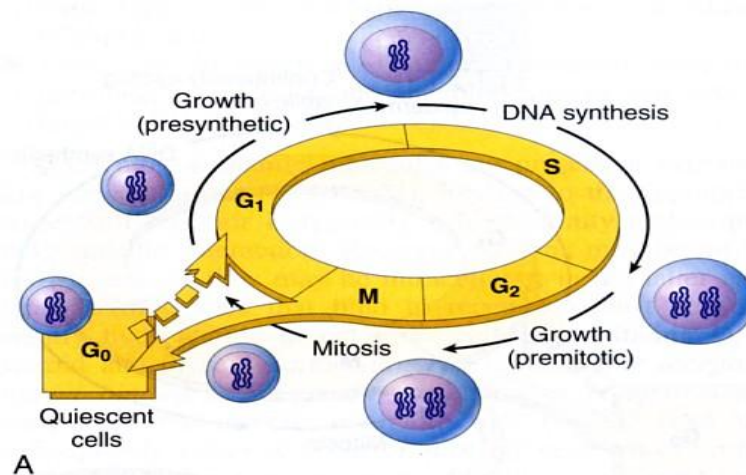
2.2.1. Pembelahan Mitosis

Pembelahan mitosis terjadi pada sel-sel tubuh, bertujuan untuk memperbaiki sel-sel yang telah rusak atau tua. Hasil utama dari mitosis adalah pembagian genom sel induk kepada dua sel anakan. Karena tiap sel anakan harus identik secara genetik dengan sel induk, sel induk harus menggandakan tiap kromosom sebelum melakukan mitosis. Proses pembelahan sel melalui satu seri mekanisme pemeriksaan (*checkpoint*) dan fase yang tetap, proses ini disebut dengan siklus sel. Pada sel normal, kerusakan DNA dan defek replikasi dapat dikenali oleh mekanisme kontrol siklus sel yang menyebabkan siklus sel berhenti, perbaikan DNA, dan atau proses apoptosis. Siklus sel dibedakan menjadi dua fase, yaitu interfase dan mitosis. Interfase terdiri atas 3 fase yaitu fase G (*growth* atau *gap*), fase S (*synthesis*), fase G₂ (*growth* atau *gap*₂).

Pembelahan mitosis dibedakan atas dua fase, yaitu kariokinesis dan sitokinesis. Kariokinesis adalah proses pembagian materi inti yang terdiri dari beberapa fase, yaitu profase, metafase, anafase dan telofase. Sedangkan sitokinesis adalah proses pembagian sitoplasma kepada dua sel anak hasil pembelahan.³⁶

1. Interfase

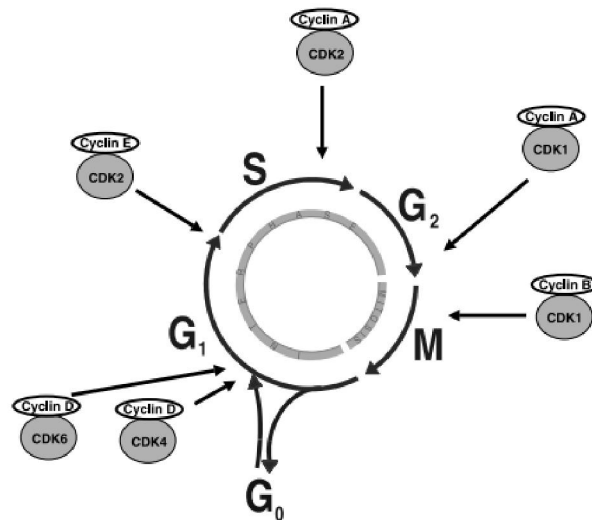
Di dalam siklus sel, secara berurutan, terdiri dari: fase presintesis (G₁), fase sintesis DNA (S), fase pertumbuhan premitosis (G₂) dan fase mitosis (M). Sel dalam keadaan diam (*quiescent*) berada dalam keadaan fisiologis (G₀).^{36,37}



Gambar 2. Fase-fase dalam siklus sel.³⁷

Sel-sel yang labil membelah terus menerus secara konstan mengikuti siklus sel dari satu mitosis ke mitosis berikutnya. Sel-sel yang secara permanen tidak lagi membelah, tidak lagi mengikuti siklus sel dan menuju kematian sel tanpa disertai pembelahan lebih lanjut. Sel-sel stabil yang berada dalam keadaan tenang di fase G₀ tidak mengikuti siklus sel dan juga tidak menuju kematian dan sewaktu-waktu dapat diinduksi untuk memasuki siklus sel jika ada stimulus yang sesuai. Mulai dan berkembangnya sel melalui siklus sel dikontrol melalui perubahan kadar dan aktivitas satu famili protein yang disebut *cyclin*. Kadar berbagai *cyclin* meningkat pada tahap tertentu di dalam siklus sel, setelah itu kadarnya dengan cepat menurun saat siklus sel berlanjut ke fase berikutnya. *Cyclin* menyelesaikan tugas regulasinya dengan menggabungkan diri dengan protein yang disebut *cyclin-dependent kinase* (CDKs). Kombinasi yang berbeda antara *cyclin* dan CDKs berhubungan dengan kombinasi apa yang diperlukan untuk fase tertentu dalam siklus sel. Ikatan *cyclin* dan CDKs memperkuat ikatannya dengan memfosforilasi

kelompok tertentu dari substrat protein yaitu *kinase phosphorylate protein* dan protein yang melawan fungsi regulasi yaitu *phosphatase dephosphorylate protein*.^{36,37}



Gambar 3. Aktivitas regulasi kompleks cyclin-CDK terhadap siklus sel.³⁷

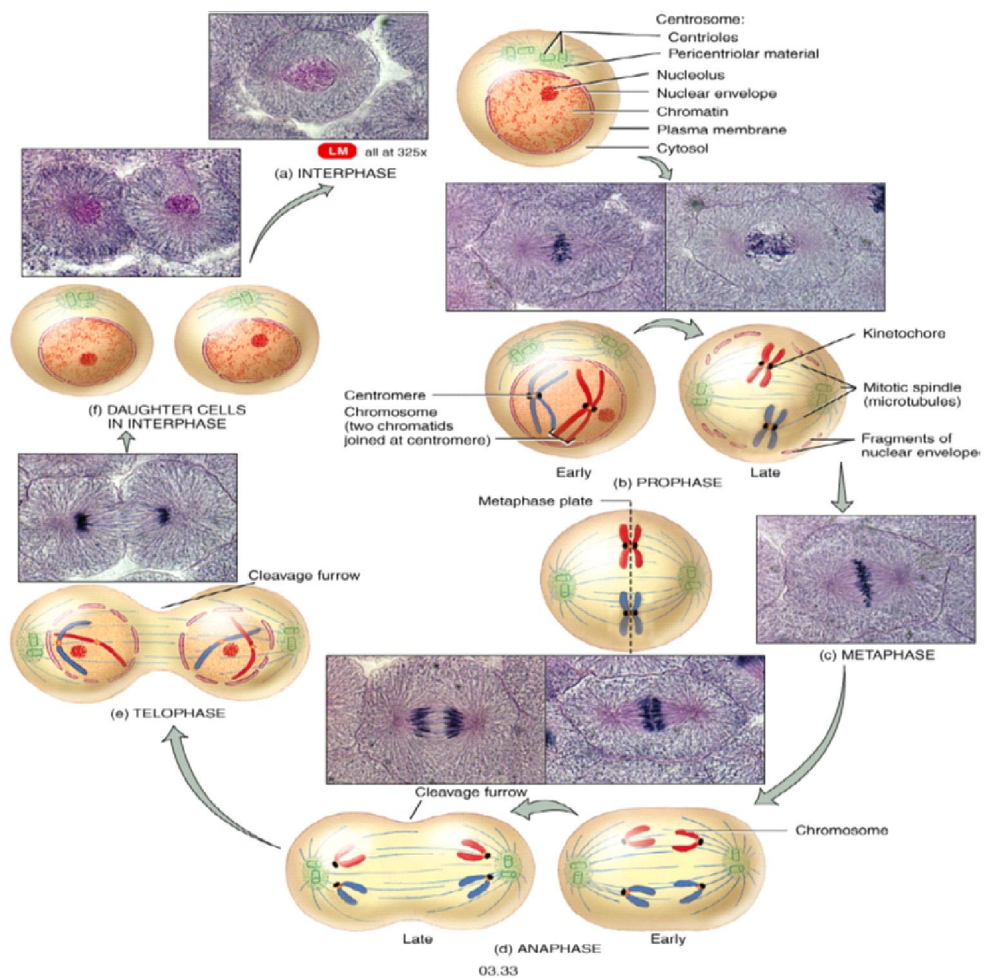
Contoh spesifik berkenaan dengan CDK1, dimana ia mengontrol transisi kritis dari G₂ → M. Begitu sel berpindah ke fase G₂, *cyclin B* dibentuk, dan ia berikatan dengan CDK1. Kompleks *cyclin B* - CDK1 diaktivasi dengan fosforilasi. Kinase yang aktif tersebut memfosforilasi sejumlah protein yang berperan pada mitosis, termasuk yang berperan pada replikasi DNA, depolimerisasi inti lamina, dan pembentuk spindle mitotik. Setelah sel membelah, *cyclin B* berdegradasi melalui jalur *ubiquitin-proteosomal* sampai muncul stimulus pertumbuhan berikutnya dan membentuk *cyclin* yang baru lagi, sel sementara tidak mengalami mitosis.^{35,36}

Kompleks *cyclin*-CDK juga diatur oleh ikatan CDK *inhibitor* dalam proses membantu sintesis dan degradasi *cyclin*. Hal ini khususnya sangat penting dalam mengatur *checkpoint* siklus sel ($G1 \rightarrow S$ dan $G2 \rightarrow M$). Titik dimana sel-sel mengambil *stock* apakah DNA-nya cukup bereplikasi dan semua kesalahan telah diperbaiki sebelum berkembang ke tahap berikutnya. Kegagalan monitor replikasi DNA secara sangat teliti menyebabkan akumulasi mutasi dan memungkinkan transformasi ke arah malignansi. Sebagai contoh, saat DNA rusak, misalnya oleh radiasi ultra violet, *tumor supresor gen*, protein TP53 telah mengalami stabilisasi dan menginduksi transkripsi CDKN1A (p21), suatu CDK *inhibitor*. CDKN1A menyebabkan sel beristirahat pada fase G1 atau G2 sampai DNA bisa diperbaiki, pada saat tersebut kadar TP53 menurun, CDKN1A berkurang, dan sel bisa diproses melalui *checkpoint* tersebut. Jika kerusakan DNA terlalu berlebihan, TP53 akan memulai suatu urutan peristiwa agar meyakinkan sel untuk bersedia bunuh diri atau apoptosis.³⁶

Sel mempersiapkan diri untuk mensintesa DNA pada fase G1 ke S. Terdapat suatu *restriction point* (R) dimana bila sel telah melampaui titik ini, sel tidak memerlukan *mitogenic growth factor* lagi untuk memasuki fase S. Penurunan aktivasi *cyclin*-CDK pada fase ini akan memfosforilasi retinoblastoma (pRb) protein. Fosforilasi pRb pada atau dekat dengan R point, akan menginaktivasi pRb sehingga akan dilepaskan faktor transkripsi E2F yang menyebabkan sel akan mentranskripsi gen untuk sintesa protein pada fase S.³⁶

2. Fase Mitosis

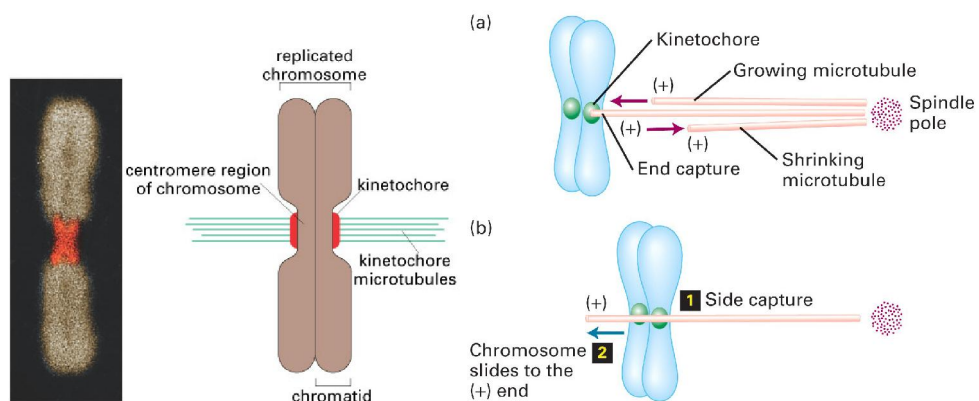
Selama fase ini sel melalui dua fase yaitu kariokinesis dan sitokinesis. Kariokinesis adalah proses pembagian materi inti yang terdiri dari beberapa fase yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase. Sedangkan sitokinesis adalah proses pembagian sitoplasma kepada dua sel anak hasil pembelahan.^{35,38}



Gambar 4. Fase-fase dalam mitosis.³⁵

a. Fase profase

Kromatid mengalami kondensasi menjadi lebih pendek dan lebih padat sehingga terbentuk kromosom. Sentrosom yang telah menduplikasi, mulai memproduksi mikrotubulus. Mikrotubulus terus diproduksi ke segala arah, sebagian mikrotubulus dari kutub yang berlawanan bertemu dan berikatan dan mendorong sentrosom bergerak ke kutub sel. Kromosom terus mengalami kondensasi. Membran nukleus menghilang, pecah menjadi fragmen kecil sehingga kromosom terapung didalam sitoplasma setelah itu nukleolus menghilang. Setiap kromosom membentuk kinetokor pada setiap sisi sentromer. Sentromer merupakan kompleks protein, tempat melekatnya mikrotubulus pada kromosom. Kinetokor memiliki molekular motor yang menggunakan ATP untuk menarik mikrotubulus dan terus memanjang sehingga ujung mikrotubulus bertemu dengan mikrotubulus dari kutub lain menjadi mikrotubulus polar membentuk *mitotic spindle*. Mikrotubulus yang menempel pada kinetokor disebut mikrotubulus kinetokor.



Gambar 5. Kromosom pada fase Mitosis.³⁵

b. Fase metafase

Kromosom akan berjajar di garis tengah gelondong (*equatorial plane*), mikrotubulus kinetokor saling tarik menarik. Setiap kinetokor harus berhubungan dengan mikrotubulus. Bila ada yang terlewat, kinetokor akan memberikan sinyal sehingga proses mitosis tidak berlanjut ke tahap selanjutnya (*mitotic spindle check point*).

c. Fase anafase

Pada fase ini terjadi 2 peristiwa:

1. Protein yang mengikat 2 kromatid terputus
 2. Mikrotubulus kinetokor memendek menarik kromatid ke arah kutub sel
- Mikrotubulus polar terus memanjang untuk persiapan sitokinesis. Sitokinesis di akhir anafase dimana sel membagi sitoplasma sama banyak sehingga terbentuk genetik identik untuk setiap sel anakan.

d. Fase telofase

Pada fase ini mikrotubulus kinetokor menghilang, mikrotubulus polar terus memanjang untuk persiapan sitokinesis. Kromosom mencapai kutub sel kemudian mulai membentuk membran inti dengan menggunakan fragmen membran inti sel induk yang kemudian menyelubungi kromosom. Selanjutnya nukleus dan kromosom mengalami penguraian.³⁵

Pada kanker, terdapat perubahan kontrol genetik terhadap pembelahan sel menghasilkan proliferasi sel yang tidak terkendali. Mutasi terutama terjadi pada protoonkogen dan *tumor suppressor gen* terutama pada gen p53 sehingga terjadi pertumbuhan tumor. Selain itu juga terjadi mutasi pada gen pengkode

CDK, *cyclins*, *CDK-activating enzymes*, CKI, substrat CDK, dan *protein checkpoint*.^{38,39}

2.2.2 Ki-67 Labelling Index

Pertumbuhan jaringan normal maupun jaringan tumor ditentukan oleh keseimbangan antara proliferasi sel atau mitosis, dan kematian sel yang terdiri dari apoptosis dan nekrosis. Interaksi antara proliferasi sel dan kematian sel bersifat dinamis dimana kedua informasi tersebut dapat menyediakan informasi mengenai prognosis. Dengan melihat proliferasi sel tumor dapat digunakan menilai respon kemoterapi, radiasi dan hormonal.³⁶

Ki-67 *Labelling Index* dapat digunakan untuk mengukur proliferasi sel. Antigen Ki-67 adalah protein yang dikode oleh gen MKI67 pada manusia dan merupakan marker seluler terjadinya proliferasi pada populasi sel. Pemeriksaan immunohistokimia Ki-67 dapat mengenali antigen proliferasi spesifik. Berbeda dengan indeks mitosis yang hanya dapat mendeteksi sel hanya pada fase M dan bergantung pada periode waktu antara pengambilan dan fiksasi spesimen.¹⁷

Penelitian tentang proliferasi sel tumor melanoma berdasarkan indeks mitosis dan ekspresi antigen Ki-67 sangat berhubungan dengan ketebalan tumor, adanya ulserasi dan nekrosis, derajat invasi berdasar metode Clarks, dan invasi vaskular. Akan tetapi, K-67 dapat memprediksi atau sebagai indikator prognosis yang lebih baik dibanding indeks mitosis.⁴⁰ Penelitian lain berupa pemeriksaan aktivitas proliferasi sel kanker kolorektal dengan imunohistoimia Ki-67, dimana dilakukan pemeriksaan terhadap 89 spesimen kanker kolorektal menunjukkan

bahwa tingginya ekspresi Ki-67 berkorelasi dengan prognosis buruk, tidak didapatkan korelasi antara jenis kelamin, usia, dan stadium klinis penyakit.⁴¹

2.3 *Phaleria macrocarpa*

Phaleria macrocarpa termasuk dalam famili *Thymelaceae* yang dikenal sebagai mahkota dewa. Tanaman ini berasal dari pulau Papua pada daerah tropis dengan curah hujan sekitar 1000-2500 mm/tahun pada ketinggian 10-1200 meter di atas permukaan laut. Tanaman ini dapat mencapai tinggi 1-6 meter terdiri dari batang, daun, bunga dan buah. Buah *Phaleria macrocarpa* berbentuk lonjong dengan diameter 3 cm berwarna hijau yang berubah menjadi merah bila sudah matang. Buah terdiri dari kulit, daging, cangkang, dan biji. Ketebalan kulit buah 0,5-1 mm, dengan tebal daging bervariasi.

Kajian pustaka yang telah ada menyebutkan bahwa genus *Phaleria* umumnya memiliki aktifitas antimikroba, hal ini berkaitan dengan toksisitas tanaman yang cukup tinggi untuk pertahanan diri. Adanya aktifitas antimikroba ini berhubungan dengan potensi antikanker terhadap sel pada siklus tertentu.

Ekstrak terhadap daging buah dan kulit biji *Phaleria macrocarpa* menunjukkan adanya zat aktif alkaloid, terpenoid, saponin, flavonoid dan polifenol berupa *gallic acid* (*GA* : *3,4,5-trihydroxybenzoic acid*). Phenol telah diketahui memiliki beberapa aktivitas biologik berupa antioksidan, antimutagenik, antikarsinogenik, antiinflamasi dan antimikroba pada manusia. Kandungan phenol paling banyak terdapat pada mesocarp sebesar 60.5 ± 0.18 mg GAE/g.⁴² Penelitian terhadap senyawa *gallic acid* dari buah *Phaleria macrocarpa* menunjukkan bahwa

senyawa tersebut secara selektif menginduksi kematian sel kanker, seperti pada kanker esofagus (TE-2), kanker lambung (MKN-28), kanker kolon (HT-29), kanker payudara (MCF-7), kanker cervix (CaSki), dan tumor otak ganas (CGNH-89 dan CGNH-PM) dengan cara menghambat proliferasi sel kanker.¹³

Senyawa *polifenol* yang terkandung dalam *herbal medicine* juga mempunyai efek memblok reseptor *growth factor*, dan menghambat *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), pada jalur sinyal *Receptor Tirosin Kinase* (RTKs).^{12,13} Pada penelitian yang dilakukan terhadap kanker payudara ditemukan bahwa senyawa *polifenol* yang terkandung dalam *herbal medicine* (teh hijau) mempunyai efek inhibisi pada MAPK.¹⁴ *Polifenol* juga akan memblok berbagai RTKs, seperti *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGR.) yang sangat berperan dalam mitosis sel.¹⁵

Tabel 2. Total kandungan phenol dan flavonoid dari berbagai bagian buah *Phaleria macrocarpa*.⁴¹

Sample	Total phenolic ^a (mg/g DM)	Total flavonoid ^b (mg/g DM)
Pericarp	59.2 ± 0.04	161.3 ± 1.58
Mesocarp	60.5 ± 0.17	131.7 ± 1.66
Seed	47.7 ± 1.04	35.9 ± 2.47

^aGallic acid equivalent. ^bRutin equivalent. The analyses were done in three replications.

Tabel 3. Nilai IC₅₀ dari ekstrak *Phaleria macrocarpa* terhadap kanker kolon, kanker payudara, sel Hela, sel hepar.¹³

Sample	IC ₅₀ Values (µg/ml)			
	HT-29	MCF-7	HeLa	Chang Liver
Pericarp	70.1 ± 1.94***	33.5 ± 1.74***	40.8 ± 2.01***	103.5 ± 0.65***
Mesocarp	63.8 ± 0.95***	26.2 ± 2.01	37.2 ± 1.89***	110.7 ± 0.71***
Seed	38.4 ± 0.37	25.5 ± 1.37	29.5 ± 1.09**	67.8 ± 0.27***
Tamoxifen	37.5 ± 0.84	24.2 ± 1.91	28.8 ± 1.94	45.6 ± 0.62

Berdasarkan data dari tabel tersebut seluruh ekstrak *Phaleria macrocarpa* memiliki aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap berbagai sel kanker dengan nilai IC_{50} yang bervariasi. Berdasarkan penelitian anti kanker *in vitro* suatu ekstrak tanaman memiliki potensi aktivitas anti kanker *in vitro* bila nilai $IC_{50} < 100$ $\mu\text{g/ml}$.⁵⁵ Aktivitas anti kanker *Phaleria macrocarpa* yang paling berpotensi terhadap kanker kolon terdapat pada biji dengan $IC_{50} 38.4 \pm 0.37$ $\mu\text{g/ml}$. Selain itu bila dibandingkan dengan Tamoxifen sebagai kontrol positif tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara Tamoxifen dengan biji *Phaleria macrocarpa* dalam hal aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon.¹³

Kandungan Flavonoid pada *Phaleria macrocarpa* merupakan senyawa inhibitor spesifik terhadap CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) yang dapat merubah aktivitas proliferasi sel. Seperti yang diketahui progresi siklus sel dikontrol oleh aktivitas CDKs sehingga senyawa flavonoid dapat berperan sebagai agen anti tumor. Penelitian mengenai potensi flavonoid terhadap siklus sel dimana diteliti kompleks CDK2 - L868276 (flavopiridol analog) menunjukkan bahwa ikatan tersebut memiliki afinitas yang kuat dibanding ikatan kompleks CDK - ATP sehingga memiliki potensi inhibitor yang lebih kuat dengan $IC_{50} : 0,4$ μM .⁴⁴ Penelitian lain yang dilakukan pada siklus sel glioblastoma ditemukan bahwa senyawa Flavonoid berupa Jaceosidin dapat menginduksi *arrest* pada fase G2/M pada sel U87 Glioblastoma, *upregulation* gen p53 dan p21, *downregulation* cyclin B1 dan CDK1 yang memungkinkan terjadinya repair kerusakan DNA sebelum mitosis.⁴⁵ Penelitian mengenai inhibisi CDK sebagai terapi anti kanker menunjukkan bahwa kandungan flavonoid pada berbagai tanaman dapat berperan

dalam proses antikarsinogenesis yang disebabkan mekanisme inhibisi *Tyrosine kinase*. Berbagai aktivitas inhibisi flavopiridol telah diketahui seperti terhadap CDK1-Cyclin B ($IC_{50} = 0,3 \mu M$), CDK2-Cyclin A ($IC_{50} = 0,28 \mu M$), CDK4-Cyclin D1 ($IC_{50} = 0,4 \mu M$), dan CDK7-Cyclin H ($IC_{50} = 0,3 \mu M$).⁴⁶

2.4 5FU - Leucovorin

Sekitar 30% penderita yang terdiagnosis kanker kolon datang sudah dengan metastasis, dan 25-30% lainnya kemudian berlanjut menjadi penyakit metastasis, sehingga modalitas pengobatan seperti kemoterapi dibutuhkan baik secara tersendiri maupun bersifat *adjuvant* setelah pembedahan.⁴⁷ Terdapat peningkatan *5-years survival* pada pasien dengan kanker kolon stadium III yang hanya dilakukan pembedahan sebesar kurang dari 50% menjadi lebih dari 70% apabila dilanjutkan dengan kemoterapi *adjuvant* 5FU kombinasi dengan oxaliplatin. Akan tetapi kombinasi tersebut lebih toksik dan memberi efek samping yang lebih berat daripada pemberian 5FU saja.^{48,49}

5-Fluorouracil (5FU) adalah antimetabolit analog *fluoropyrimidine* yang bekerja pada siklus sel spesifik yaitu pada fase S. Setelah teraktivasi akan berubah menjadi bentuk metabolit sitotoksik yaitu FdUMP yang menghambat target enzim *Thymidylate synthase*. Hambatan terhadap *Thymidylate synthase* menghasilkan akumulasi dUMP yang gagal membentuk dUTP di dalam DNA dengan hasil akhir penghambatan sintesis dan fungsi DNA. 5FU yang diberikan secara intravena akan terdistribusi secara luas ke jaringan dengan konsentrasi tertinggi pada mukosa gastrointestinal, sumsum tulang, dan hepar. Penetrasi kemudian terjadi

penumpukan ke rongga ketiga seperti pada ascites dan efusi pleura. 5FU dapat melewati sawar darah otak dan berdistribusi ke LCS dan jaringan otak, yang kemudian terjadi proses metabolisme enzimatik intraseluler menjadi metabolit aktif. Lebih dari 90% metabolit diekskresikan melalui ginjal dan paru. Toksisitas 5FU berupa myelosupresi dimana neutropenia dan trombositopenia lebih sering terjadi daripada anemia, selain itu mukositis dan diare, gangguan indra pengecap, *Hand-foot syndrome* yang ditandai dengan kesemutan, nyeri, eritema, bengkak, hiperpigmentasi, gatal pada tangan dan kaki.^{50,51}

Sampai saat ini tidak terdapat agen tunggal lain yang lebih efektif sebagai terapi lini pertama kecuali 5FU yang sudah tersedia sejak 40 tahun yang lalu. Leucovorin merupakan folat tereduksi yang dapat meningkatkan aktivitas antitumor dan toksisitas 5FU, menstabilkan kompleks *Thymidylate synthase*-FdUMP-folat menghasilkan inhibisi maksimal *Thymidylate synthase*. Modulasi leucovorin meningkatkan angka respon tetapi tidak dapat meningkatkan *survival*.⁵²

Menurut NCCN *Guidelines* 2013 pasien dengan kanker kolon stadium II resiko tinggi mulai dapat diberikan kemoterapi *adjuvant* 5FU-Leucovorin. QUASAR *Trial* mengindikasikan keuntungan *survival* yang bermakna pada pasien stadium II yang dilanjutkan dengan kemoterapi 5FU-Leucovorin dengan angka resiko rekurensi relatif dalam 2 tahun sebesar 0,71. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada angka *DFS* antara pemberian FOLFOX dibanding pemberian 5FU-Leucovorin selama *follow up* 6 tahun ($p=0.258$).⁵

Penelitian sebanyak 420 pasien dengan kanker kolon stadium lanjut yang diberikan kemoterapi 5FU-leucovorin dengan atau tanpa oxaliplatin. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil regimen 5FU-leucovorin dengan oxaliplatin memiliki angka *progression-free survival* lebih lama secara signifikan ($p=0,0003$) dan memiliki angka respon yang lebih baik ($p=0,001$). Akan tetapi tidak bermakna dalam hal *Overall Survival* ($p=0,12$). Penambahan oxaliplatin memiliki frekuensi toksisitas yang lebih tinggi berupa neutropenia, diare, toksisitas neurosensori, akan tetapi toksisitas tersebut tidak menurunkan *Quality of Life*.⁵²

Walaupun tidak ada *gold standard* pemberian regimen 5FU-leucovorin, 5 hari pemberian sesuai regimen *Mayo Clinic* setiap bulan saat ini digunakan sebagai terapi referensi penelitian fase III. Pada penelitian sebelumnya menggunakan regimen pemberian kemoterapi LV5FU2 berupa pemberian 5FU-leucovorin bolus disertai infus 5FU setiap 2 minggu. Regimen ini terbukti lebih superior dibanding regimen *Mayo Clinic* dalam hal angka rekurensi (32.6% vs 14.5%), *progression-free survival* (27.6 vs 22 minggu), dan toksisitas (grade 3 atau 4 sejumlah 11.1% vs 22.9%), akan tetapi bukan dalam hal *Overall Survival*.⁵²

2.5 1,2 Dimethylhidrazine

1,2-Dimethylhydrazine Dihydrochloride atau disebut DMH, merupakan zat kima yang sering digunakan dalam penelitian eksperimental sebagai bahan karsinogenik untuk menginduksi kanker. Zat ini memiliki struktur kimia $C_2H_8N_2 \cdot 2HCl$. Dalam keadaan stabil, secara fisik berbentuk bubuk putih higroskopik. Sebelum pemakaian dilarutkan dalam air, etanol, *diethyl ether*, atau

dimethyl formamide. Zat ini memiliki titik didih 81 °C, titik lebur -9°C, dan bersifat mudah terbakar. DMH telah lama digunakan sebagai bahan karsinogen pada mencit, tikus, kelinci, atau monyet, melalui pemberian oral, subkutan, atau intramuskular, dan dapat menghasilkan berbagai macam tumor jaringan terutama tumor kolon, tumor liver, dan tumor vaskular.⁵³

Bahan kimia seperti DMH memiliki kemampuan menerima atau mendonor elektron bebas selama reaksi intrasel sehingga mampu mengkatalis pembentukan radikal bebas. Radikal bebas dapat menimbulkan jejas pada sel dengan cara timbulnya reaksi peroksidasi lipid membran, fragmentasi DNA, dan ikatan silang protein. Ikatan ganda pada membran lemak tidak jenuh mudah terkena serangan radikal bebas berasal dari oksigen. Interaksi radikal lemak menghasilkan peroksida yang tidak stabil dan reaktif dan terjadi reaksi autokatalitik. Reaksi radikal bebas dengan timin pada DNA mitokondria dan nuklear menimbulkan rusaknya untai tunggal. Kerusakan DNA tersebut telah memberikan implikasi pada kematian sel dan perubahan sel menjadi ganas. Radikal bebas juga mencetuskan ikatan silang protein yang diperantarai sulfhidril, menyebabkan peningkatan kecepatan degradasi atau hilangnya aktivitas enzimatik.⁵⁴

1,2-dimethylhidrazine setelah injeksi subkutan ditransport dan dimetabolisme di hepar dan mengalami dehidrogenasi dengan bantuan enzim berubah menjadi *azoxymethane* (AOM). Zat ini dikonversi menjadi molekul bermuatan positif sehingga bersifat elektrofilik dan disekresikan ke empedu. Bahan karsinogen ini memiliki sifat karsinogenik pada mukosa kolon. Ion elektrofilik didetoksifikasi melalui reaksi pasangan elektron bebas pada DNA

membentuk ion karbonium aktif. DNA memetilasi ion tersebut menjadi DNA adduct *O*⁶-methylguanine, dimana akumulasi menyebabkan mutasi DNA kemudian berkembang menjadi kanker.⁶¹

Penelitian terhadap tikus Fischer betina sebanyak 15 tikus konvensional dan 24 tikus *germ-free* berusia 7 minggu yang diberi DMH dengan dosis 20 mg/kgBB/minggu secara injeksi subkutan selama 20 minggu. Setelah 15 minggu sejak pemberian terakhir didapatkan perkembangan tumor kolon sebanyak 14 dari 15 tikus konvensional, dan sebanyak 5 dari 24 tikus *germ-free* yang berupa adenokarsinoma. Penelitian lain pada tikus *Sprague dawley* jantan dengan berat 200 gram dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok pertama sebanyak 109 ekor diberikan DMH sebagai dosis tunggal pada hari pertama perlakuan, kelompok kedua sebanyak 97 ekor diberikan DMH secara injeksi subkutan selama 12 minggu, dan kelompok terakhir sebanyak 100 ekor diberikan DMH secara injeksi subkutan selama 24 minggu. Pada kelompok 1 didapatkan 7 karsinoma kolon yang seluruhnya berada pada area plak limfoid, tetapi tidak didapatkan adenoma. Pada kelompok 2 didapatkan tumor kolon pada 54 ekor tikus (4 adenoma dan 50 adenokarsinoma). Pada kelompok 3 didapatkan tumor kolon pada 65 ekor tikus (8 adenoma dan 57 adenokarsinoma).⁵³

Penelitian sebelumnya berupa pemberian *1,2-dimethylhidrazine* pada 40 ekor tikus putih strain *Sprague dawley* dengan dosis 65 mg/kgBB/minggu selama 5 minggu, sebanyak 33 ekor berkembang menjadi adenokarsinoma kolon setelah 16 minggu sejak pemberian pertama.⁵⁵ Penelitian lain menunjukkan bahwa induksi *1,2-dimethylhidrazine* dosis 20 mg/kgBB/minggu, tumor kolorektal sudah

muncul 14 minggu sejak pemberian induksi pertama. Pada penelitian ini, sebanyak 32 ekor tikus putih strain *Sprague dawley* dilakukan proses adaptasi selama 1 minggu, kemudian diinduksi oleh *1,2-dimethylhidrazine* dosis 20 mg/kgBB/minggu injeksi subkutan selama 15 minggu.⁵⁶ Induksi karsinogenesis kolon yang dilakukan Dani et al menggunakan *1,2-dimethylhidrazine* dosis 30 mg/kgBB 1 x/minggu selama 16 minggu menunjukkan adanya insidensi tumor kolon sebesar 100%.⁵⁷