

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Deskripsi Data Penelitian

Deskripsi data penelitian meliputi karakteristik sampel penelitian dan distribusi karakteristik sampel.

1. Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 30 prepat kanker kolorektal dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* dan perwarnaan *Imunohistochemistry* dari 14 wanita dan 16 pria yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan karakteristik yang berbeda-beda. Peneliti melakukan pendataan pada karakteristik tersebut sebagai data pendukung yang dapat mempengaruhi ekspresi *Hypoxia Inducible Factor (HIF) -1 α* . Karakteristik yang didata dalam penelitian ini adalah umur dan jenis kelamin, dan dianalisis menggunakan Uji Fisher.

Setelah seluruh data pembacaan dianalisis, diperoleh usia pasien terbanyak adalah <60 tahun dengan jumlah 22 orang (73,3%). Jenis kelamin terbanyak pada sampel adalah pria dengan 16 orang atau sekitar 53,3%. Karakteristik sampel penelitian untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 3. Karakteristik subjek.

Karakteristik	Jumlah	Prosentase
Umur		
<60 tahun	22	73,3 %
\geq 60 tahun	8	26,7 %
Jenis Kelamin		
Pria	16	53,3 %
Wanita	14	46,7 %

2. Distribusi karakteristik sampel dengan ekspresi HIF-1 α .

Tabel 4. Hubungan karakteristik subjek terhadap ekspresi HIF-1 α .

Karakteristik	HIF-1 α (+)		HIF-1 α (-)		Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
	n	%	n	%		
Umur						
<60	6	23,3%	16	72,7%	1,000	0,645
\geq 60	2	25%	6	75%		
Jenis Kelamin						
Pria	3	18,8%	13	81,3%	0,417	0,263
Wanita	5	35,7%	9	64,3%		

p = Nilai signifikansi dimana jika $p > 0,05$ berarti tidak memiliki perbedaan yang signifikan dan $p < 0,05$ berarti memiliki perbedaan yang signifikan.

Pada tabel 4, ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) -1 α positif paling banyak di jumpai pada usia di bawah 60 tahun yaitu sebanyak 6 orang dengan prosentase 72,7%, dengan jenis kelamin wanita sebanyak 5 orang (35,7%). Berdasarkan uji fisher, diperoleh nilai signifikan (p) karakteristik usia pasien sebesar 1,000 (Exact Sig. 2-sided) dan 0,645 (Exact Sig. 1-sided). Hal ini menunjukkan bahwa $p > 0,05$ sehingga H_0 dapat diterima. Dalam karakteristik jenis kelamin diperoleh nilai signifikan sebesar 0,417 (Exact Sig. 2-sided) dan 0,263 (Exact Sig. 1-sided). Hal ini menunjukkan bahwa H_0 diterima. Hal ini menunjukkan pula bahwa H_0 dapat diterima dengan $p > 0,05$. H_0 dapat diterima pada setiap karakteristik memiliki arti bahwa setiap karakteristik memiliki peluang yang sama dalam pengekspresian *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α .

B. Deskripsi Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah derajat diferensiasi kanker kolorektal dan

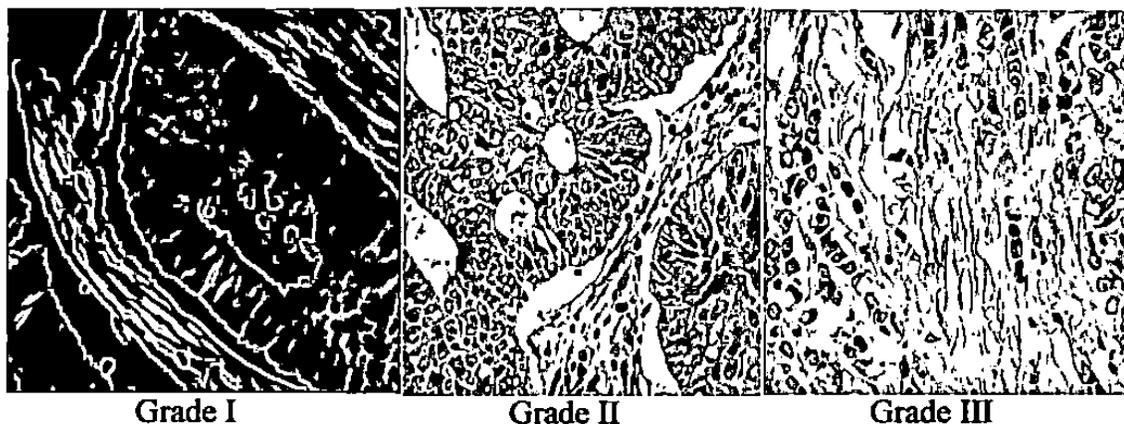
dengan melihat jumlah sampel yang masuk ke dalam karakteristik diferensiasi kanker kolorektal dan karakteristik ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) -1 α .

Derajat diferensiasi kanker kolorektal menurut WHO dibagi menjadi 3 kriteria, yaitu Grade I (tumor berdiferensiasi baik, mengandung struktur glandular >95 %), Grade II (tumor berdiferensiasi sedang mengandung komponen glandular 50-95%), dan Grade III (tumor berdiferensiasi buruk, mengandung komponen glandular 5-50% dan jenis tumor adenokarsinoma musinosum dan signet ring cell carcinoma termasuk dalam grade III). Distribusi variabel derajat diferensiasi kanker kolorektal dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 5. Karakteristik Tingkat Derajat Diferensiasi Tumor Kolorektal

Karakteristik Derajat diferensiasi tumor kolorektal	Jumlah	Prosentase
Grade I	19	63,3%
Grade II	7	23,3%
Grade III	4	13,3%
Total	30	100%

Pada tabel 5, dapat dilihat bahwa sampel yang digunakan secara histological menunjukkan derajat diferensiasi tumor terbanyak pada grade I (diferensiasi baik) sebanyak 19 preparat (63,3%) dan paling sedikit adalah derajat diferensiasi grade III (diferensiasi buruk) yaitu sebanyak 4 preparat (13,3%). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah mitosis di dalam tumor, serta derajat perbedaan antara sel kanker dan sel normal pada beberapa sampel preparat masih rendah.



Gambar 7. Mikroskopis Pulasan *Hematoxilin Eosin* Kanker Kolorektal

Tingkat ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) -1 α dikelompok dalam dua kelompok, yaitu positif (ekspresi HIF-1 α terdapat pada $\geq 50\%$ sediaan) dan negatif (ekspresi HIF-1 α $< 50\%$ sediaan). Berdasarkan tabel 4.4 dapat dilihat bahwa ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) -1 α pada sampel preparat terbanyak terekspresi negatif dengan jumlah preparat 22 buah (73,3%). Pulasan imunohistokimia HIF-1 α tampak terekspresi pada daerah nukleus dan sitoplasma.

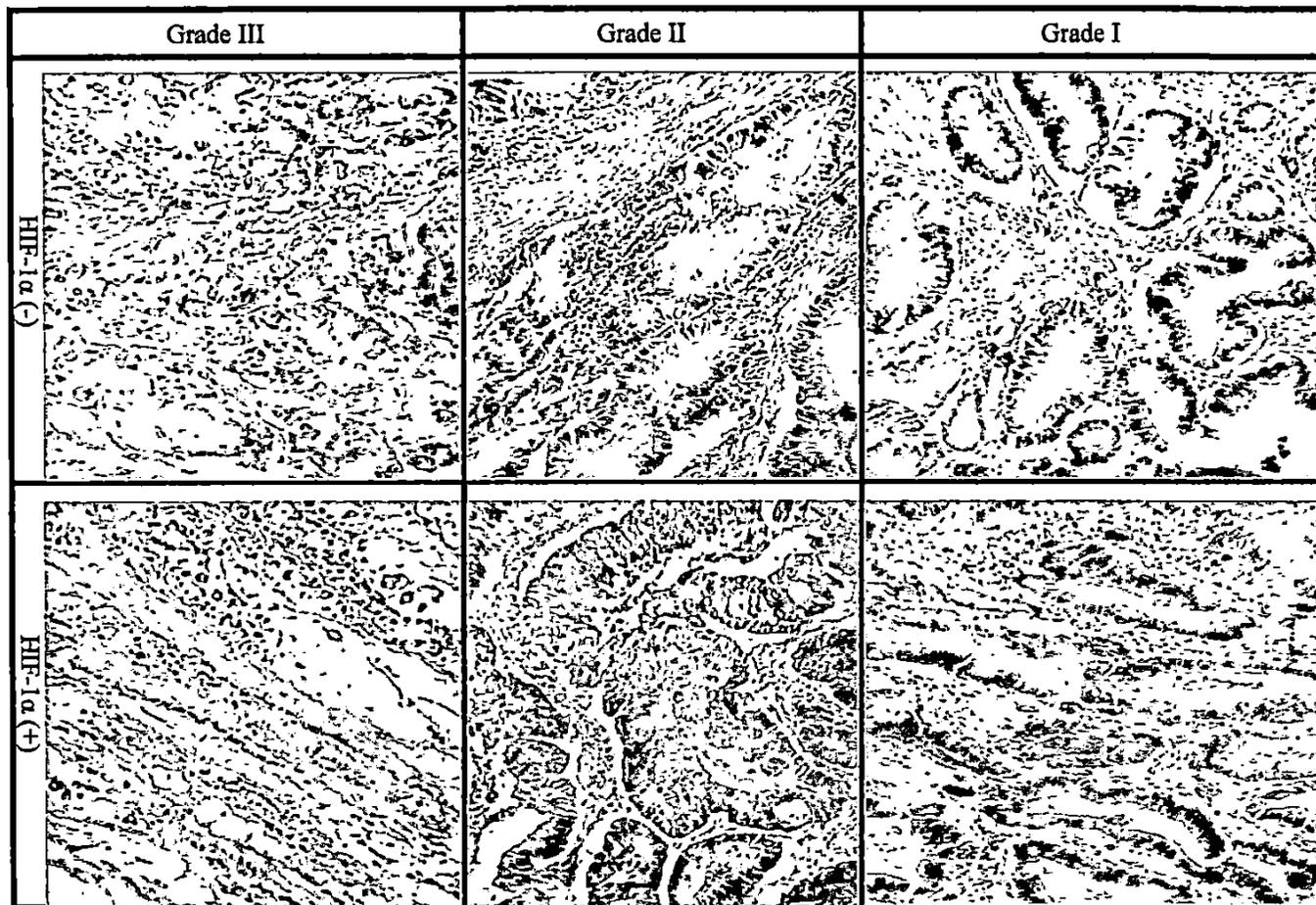
Tabel 6. Karakteristik ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) -1 α .

Karakteristik ekspresi <i>Hypoxia Inducible Factor</i> (HIF) -1 α .	Jumlah	Prosentase
Positif	8	26,7%
Negatif	22	73,3%
Total	30	100%

C. Hasil Penelitian

1. Pulasan imunohistokimia HIF-1 α

Protein HIF-1 α diekspresikan kuat di epitel sekitar tumor, terutama di daerah nekrosis, tetapi tidak dalam mukosa normal. Pulasan imunohistokimia HIF-1 α nampak terekspresi dalam jaringan tumor, terutama di bagian sitoplasma dan



2. Uji Statistik Komparatif

Pengujian ini menggunakan uji komparatif *Kolmogorov Smirnov* antara varian variabel terikat dan varian variabel bebas. Jika taraf signifikansi yang dihasilkan nilai uji *Kolmogorov Smirnov* $<0,05$ maka disimpulkan bahwa data memiliki hubungan antara variabel satu dengan variabel yang lain.

Hasil perhitungan dan analisis derajat diferensiasi kanker kolorektal dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 7. Hubungan HIF-1 α Terhadap Derajat Diferensiasi Tumor

Karakteristik	HIF - 1 α (+)		HIF - 1 α (-)		Asymp. Sig. (2-sided)
	Jumlah	Persentase	Jumlah	Persentase	
Derajat Diferensiasi Tumor					
Good	2	10,5 %	17	89,5 %	0,081
Moderate	3	42,9 %	4	57,1 %	
Poor	3	75 %	1	25 %	

p = Nilai signifikansi dimana jika $p > 0,05$ berarti tidak memiliki perbedaan yang signifikan dan $p < 0,05$ berarti memiliki perbedaan yang signifikan.

Tabel 7 menunjukkan analisis data hubungan antara derajat diferensiasi kanker kolorektal dengan ekspresi HIF-1 α . dari tabel diatas menunjukkan hasil pembacaan derajat diferensiasi kanker kolorektal dengan ekspresi HIF-1 α . Jumlah derajat diferensiasi grade I dengan ekspresi HIF-1 α positif ada 2 preparat atau 10,5% sedangkan yang negatif sebanyak 17 preparat atau 89,5%. derajat diferensiasi grade II yang ekspresi HIF-1 α positif lebih sedikit daripada HIF-1 α negatif, yaitu 3 preparat atau 42,9% sedangkan yang negatif ada 4 preparat atau 57,1%. Sedangkan derajat diferensiasi grade III dengan ekspresi HIF-1 α positif ada 3 preparat atau 75% sedangkan yang negatif sebanyak 1 preparat atau 25% dari keseluruhan jumlah sampel preparat. Dari hasil analisis yang telah dilakukan

diperoleh nilai sig 0,081 ($p>0,05$) yang berarti tidak ada hubungan yang bermakna antara diferensiasi kanker kolorektal dengan ekspresi HIF-1 α .

D. Pembahasan

Secara umum, terjadinya kanker kolorektal dihubungkan dengan faktor genetik dan lingkungan. Pria dan usia tua merupakan salah satu dari beberapa faktor resiko kanker kolorektal, hal ini selaras dengan rasio hasil penelitian kejadian kanker kolorektal antara pria dan wanita sebesar 53,3% : 46,7% (16 jiwa: 14 jiwa) yang didukung dengan data *International Agency For Research On Cancer* (IARC) dengan insidensi antara pria dan wanita di dunia adalah 54,8%: 45, 1% (746 jiwa : 614 jiwa) (IARC, 2012). Tetapi, hal tersebut berbeda dengan faktor resiko usia tua, dari hasil penelitian didapatkan kejadian kanker kolorektal terbanyak pada umur dibawah 60 tahun, serupa dengan data IARC. Pada beberapa negara, usia penderita kanker kolorektal berkisar antara 60 tahun hingga 10 tahun (IARC, 2012). Terjadinya pergeseran usia penderita tersebut mungkin disebabkan oleh gaya hidup masyarakat saat ini.

Penentuan derajat (grading) suatu kanker merupakan upaya untuk memperkirakan agresivitas atau tingkat keganasan berdasarkan diferensiasi sitologik sel tumor dan jumlah mitosis di dalam tumor. Tingkat diferensiasi tumor ganas sangat berguna secara klinis, baik karena mempunyai korelasi yang kuat dengan kemungkinan hidup penderita (prognosis), maupun karena memberikan arah pengobatan yang paling tepat (Kumar, *et al.*, 2007).

Penelitian ini menganalisis hubungan ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α terhadap derajat diferensiasi kanker kolorektal. Ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α meliputi ekspresi HIF-1 α negatif (-) dan ekspresi HIF-1 α positif (+). Tingkat ekspresi HIF-1 α dikategorikan menjadi negatif (-) apabila sediaan menunjukkan ekspresi HIF-1 α <50% sediaan, positif (+) apabila ekspresi HIF-1 α terdapat pada \geq 50% sediaan. Derajat diferensiasi kanker kolorektal dilihat sesuai dengan kriteria WHO, yaitu jumlah sel granular, serta derajat perbedaan antara sel kanker dan sel normal (Abrams, Gerald, 2009). Hubungan kedua variabel tersebut dianalisis menggunakan *Kolmogrov Smirnov Test*. Penggunaan *Kolmogrov Smirnov Test* ini didasarkan bahwa penelitian ini ingin menganalisis hubungan antara ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)-1 α terhadap derajat diferensiasi kanker kolorektal. Jenis tabel yang digunakan adalah 2x3 dan menggunakan *Chi-square Test*, namun setelah dianalisis didapatkan *expected count* <5 sebanyak 3 *cell* yang menjadikan penggunaan *Chi square Test* tidak memenuhi syarat, sehingga untuk analisis digunakan uji alternatifnya yaitu *Kolmogrov Smirnov Test*.

Pada hasil pembacaan preparat kanker kolorektal yang telah mengalami pengecatan didapatkan ekspresi HIF-1 α pada derajat diferensiasi tumor grade I dari 19 preparat, 2 (10,5%) terekspresi HIF-1 α positif (+) dan 17 (89,5%) terekspresi negatif (-). Sedangkan, pada derajat diferensiasi tumor grade II dari total 7 preparat, 3 (42,9%) preparat terpulas positif (+) dan pada derajat diferensiasi tumor grade III dari 4 preparat, 3 (75%) preparat dengan HIF-1 α positif (+) dan 1 (25%) untuk HIF-1 α negatif (-). Hasil analisis tersebut

didapatkan nilai $p=0,081$ yang menunjukkan tidak adanya hubungan yang bermakna antara ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)- 1α terhadap derajat diferensiasi kanker kolorektal.

Hasil analisis secara statistik penelitian kami selaras dengan hasil data statistik dari penelitian "*Expression Of HIF-1 alpha and VEGF In Colorectal Cancer: Association With Clinical Outcomes And Prognostic Implications*" oleh Cao, *et al.* Hasil dari penelitian tersebut ialah HIF- 1α dan VEGF secara signifikan terkait dengan stadium tumor, kelenjar getah bening dan metastasis hepar ($P < 0,05$). Ekspresi HIF- 1α dan VEGF dikaitkan dengan parameter klinis: umur, jenis kelamin, ukuran tumor, derajat diferensiasi histologis, dan kedalaman infiltrasi tidak signifikan ($P > 0,05$). Tetapi hal ini tidak berkorelasi dengan hasil penelitian lain yang menyebutkan bahwa terdapat hubungan antara ekspresi *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)- 1α terhadap derajat diferensiasi kanker kolorektal, seperti pada penelitian "*Hypoxia Inducible Factor-1 Modulates The Down Regulation Of The Homeodomain Protein CDX2 In Colorectal Cancer*" oleh Zheng, *et al.* Hasil penelitian tersebut membuktikan adanya hubungan antara ekspresi HIF- 1α dengan CDX2 dan hubungan kedua faktor tersebut terhadap diferensiasi tumor ($p < 0.01$).

Sebagaimana diketahui, hipoksia merupakan hasil dari ketidakseimbangan antara pengiriman oksigen dan konsumsi oksigen yang mengakibatkan penurunan tekanan oksigen di bawah tingkat normal pada jaringan tertentu (Lundgren, *et al.*, 2007). Hipoksia banyak terjadi pada proses penyakit dan tersebar luas di daerah

pembuluh darah yang ada (Harris, 2002). Proses adaptasi fisiologi dan patologi terhadap tekanan oksigen rendah (hipoksia) pada sel dan jaringan menyebabkan terinduksinya transkripsi dari serangkaian gen yang berpartisipasi dalam transporter glukosa, enzim glikolitik, angiogenesis, dan protein lain yang terlibat dalam homeostasis O₂ dan perkembangan tumor yang teraktivasi oleh HIF-1 α (Berra, *et al.*, 2003).

Hipoksia dan HIF-1 α menginduksi *growth factors*, seperti *insulin-like growth factor-2* (IGF2) dan *transforming growth factor-2* (TGF-2). Pengaktifan *growth factors* dengan reseptornya mengaktifkan jalur transduksi sinyal yang menyebabkan proliferasi sel dan merangsang ekspresi HIF-1 α itu sendiri (Semenza, 2003). Sitokin, *growth factors* serta hipoksia dalam sel, dapat mengaktifkan jalur sinyal MAPK dan PI3K, yang mempromosikan proliferasi sel serta berkontribusi terhadap siklus HIF-1 α . Hal ini menyebabkan peningkatan aktivitas transkripsi gen target HIF-1 α , termasuk *encoding* IGF2 dan TGF-2 yang berkontribusi dalam jalur *autocrine-signaling*, yang penting untuk perkembangan kanker (Semenza, 2003).

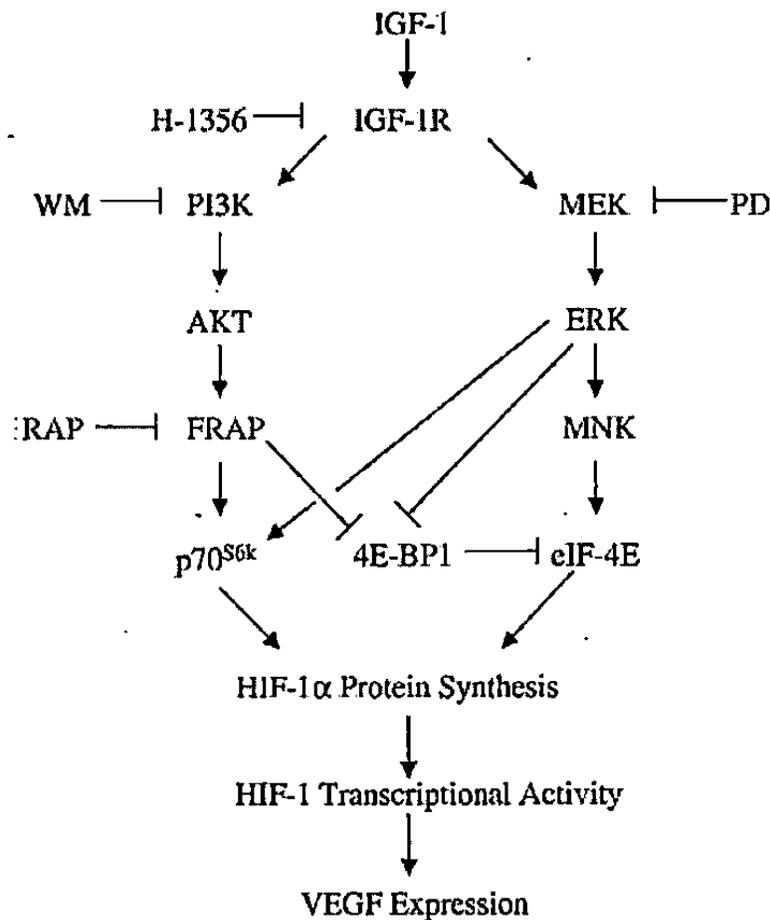
Insulin-like growth factors (IGFs) memainkan peran penting dalam mengatur proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis, dan transformasi. IGFs akan teraktivasi dengan berinteraksi dengan reseptor spesifik pada membran sel, yaitu reseptor IGF-I (IGF-IR), dan interaksi tersebut diatur oleh sekelompok protein pengikat spesifik. Anggota dari *insulin-like growth factors* (IGFs) mencakup polipeptida IGF I dan IGF II, dua jenis reseptor membran sel (yaitu IGF-IR dan IGF-

IIR), dan enam protein *insulin-like growth factor binding protein* yaitu IGFBP-1 sampai IGFBP-6 (Yu, 2000).

Insulin-like growth factors I reseptor (IGF - IR) berikatan oleh ligan yang cukup hidrofobik agar dapat memasuki sel. Pengikatan ligan mengaktifkan pembentukan kompleks reseptor ligan yang secara langsung berhubungan dengan DNA inti sel dan selanjutnya mengaktifkan ataupun menghentikan transkripsi gen (Kumar, *et al.*, 2007). Kompleks reseptor ligan mengontrol proliferasi sel dalam berbagai cara, yaitu mengirimkan sinyal mitogenik, melindungi sel dari berbagai cedera apoptosis, mendorong pertumbuhan ukuran sel (persyaratan untuk pembelahan sel), memainkan peran penting dalam pembentukan dan pemeliharaan perubahan fenotip sel, mengatur adhesi sel dan motilitas sel, dan menginduksi diferensiasi terminal (Valentinis & Serga, 2001).

Insulin-like growth factor 1 reseptor tirosin kinase (IGF-1R) diaktifkan dengan mengikat salah satu dari ligan, IGF-1 atau IGF-2. IGF-1R *signaling* melalui jalur mitogen mengaktivasi protein (MAP) kinase dan phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) yang memainkan peran penting dalam transformasi dan tumorigenesis. Ekspresi gen IGF2 merupakan *up-regulator* setiap gen dalam sel kanker kolorektal dan relatif pada epitel *colon* normal, sehingga dapat menstimulasi *autocrine-signalling* sel yang mengekspresikan reseptor dan ligan. Selain efek dari IGF-1R untuk transformasi sel, proliferasi dan metastasis, pengikatan IGF-1 juga menginduksi transkripsi faktor gen VEGF yang penting untuk angiogenesis tumor. Berbagai jalur *growth factor-receptor tyrosine*

onkogenik RAS, ekspresi VEGF tergantung pada aktivitas kinase MAP/ extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase 1 (MEK-1) pada fibroblas, tetapi juga tergantung pada aktivitas PI3-kinase pada sel epitel. Jalur sinyal selular tersebut memodulasi ekspresi gen dengan mengubah aktivitas atau ekspresi faktor transkripsi spesifik. Stimulus fisiologis utama untuk ekspresi VEGF adalah hipoksia seluler, hipoksia menginduksi transkripsi gen VEGF yang dimediasi oleh HIF-1 α (Fukada, *et al.*,2002).



Gambar 9. Mekanisme Molekuler HIF-1 α Dimediasi IGF-1
(Fukada, *et al.*,2002)

Secara fungsional, IGF-1 tidak hanya mengindikasi proliferasi sel tetapi

IGF-1 memiliki dampak besar pada pertumbuhan tumor. IGF-1 memiliki efek langsung dan jangka panjang pada berbagai kegiatan selular, dan efek ini dimediasi terutama melalui IGF-1R. IGF-1 mendesak terjadinya anabolik akut pada protein dan metabolisme karbohidrat dengan meningkatkan ambilan asam amino, glukosa, dan glikogen dengan meningkatkan sintesis protein. IGF-1 juga memiliki dampak jangka panjang pada proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis. IGF-1 adalah mitogen ampuh untuk berbagai macam sel dan mengerahkan aksi mitogenik dengan meningkatkan sintesis DNA dan dengan merangsang ekspresi cyclin D1, yang mempercepat perkembangan siklus sel dari G1 ke fase S. Efek mitogenik dari IGF-1 dapat dihapuskan dengan menekan ekspresi cyclin D1. Selain merangsang perkembangan siklus sel, IGF-1 juga menghambat apoptosis. IGF-1 mampu merangsang ekspresi protein Bcl dan untuk menekan ekspresi Bax, yang menghasilkan peningkatan dalam jumlah relatif dari heterodimer Bcl/Bax, sehingga menghalangi inisiasi jalur apoptosis (Gombos, *et al.*, 2012).

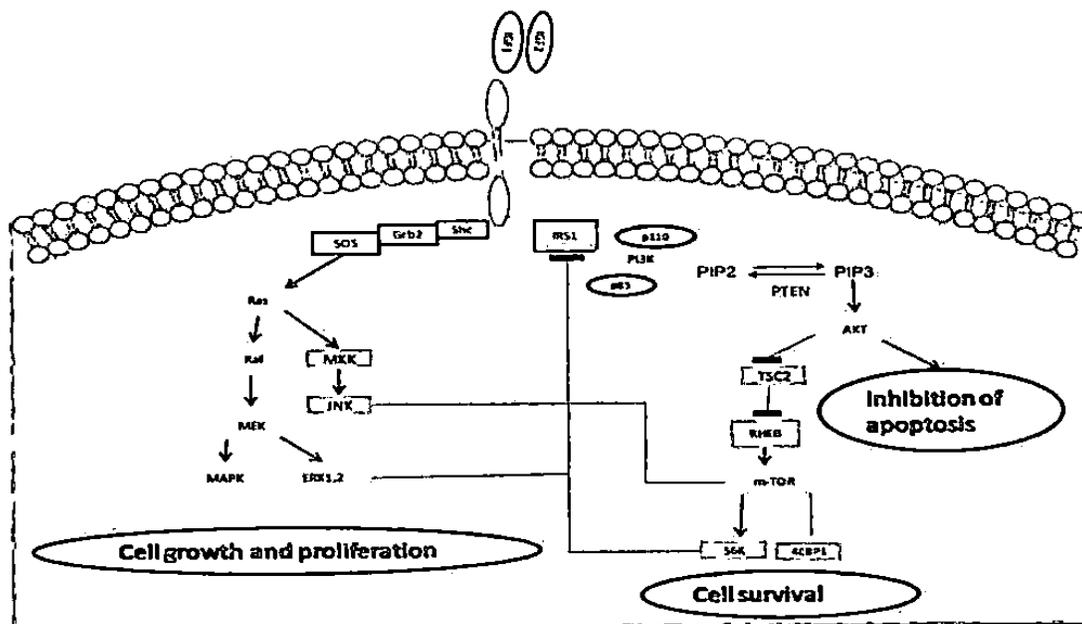
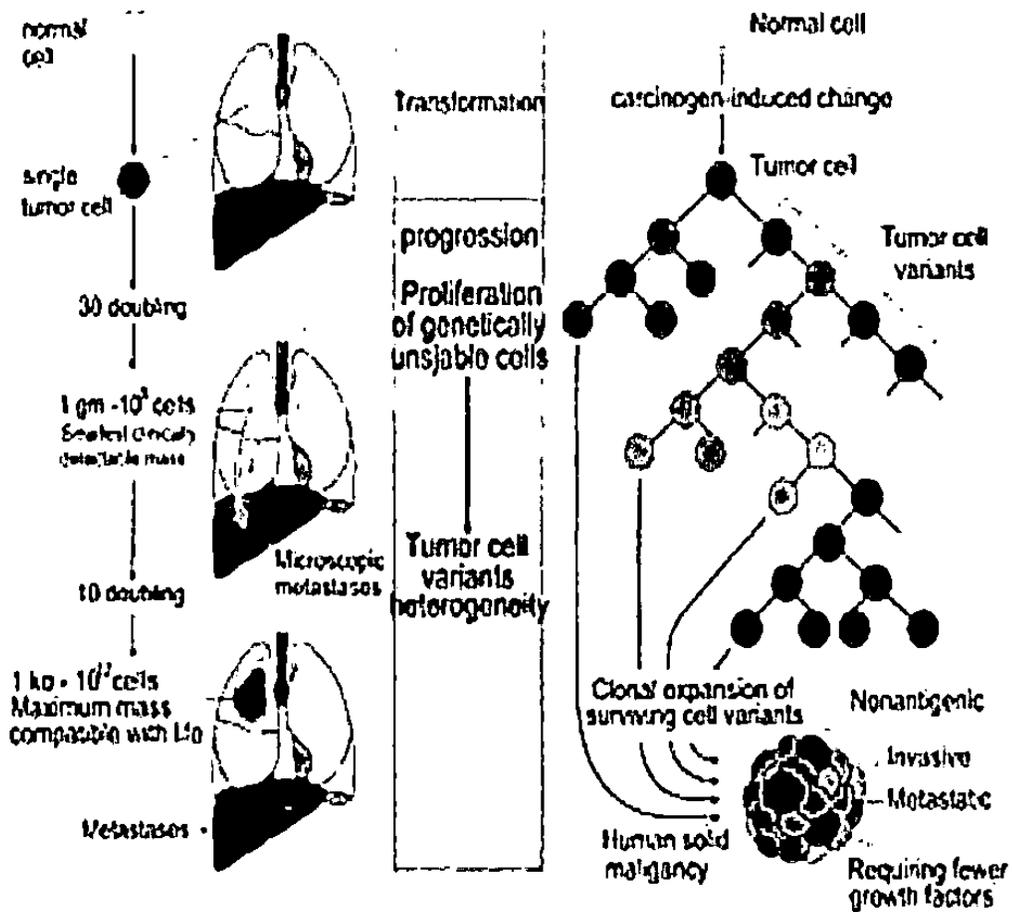


Figure 10. Diagram of the signaling pathways of IGF-1R (Gombos, *et al.*, 2012)

Famili reseptor tirosin kinase ini berperan pada berbagai proses sel neoplastik termasuk proliferasi. Semua perubahan tersebut mempengaruhi laju pertumbuhan tumor dan laju pertumbuhan tumor berhubungan dengan derajat diferensiasi tumor. Proliferasi sel adalah pembelahan sel dan pertumbuhan sel, mekanisme dan pengaturan proliferasi sel didasari oleh adanya siklus sel. Derajat diferensiasi secara umum berhubungan dengan tingkat keganasan dan proliferasi sel, sehingga tumor yang derajat diferensiasinya buruk akan mempunyai tingkat proliferasi yang lebih tinggi (Kumar, *et al.*, 2007)



Growth biology of tumor

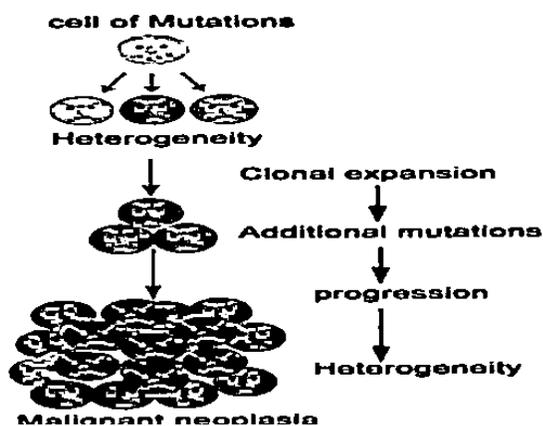
Saat tumor berkembang biak, populasi mutan mengalami penyeleksian yang menghilangkan beberapa sel tumor, sel neoplastik kurang agresif dieliminasi dan sel-sel yang lebih agresif bertahan hidup. Mekanisme pertahanan sel tumor dan hasil seleksi sel tumor merupakan prinsip yang sangat penting secara teori dan klinis:

1. Perkembangan Tumor.

Banyak tumor menjadi lebih agresif dan memperoleh potensi ganas lebih besar dari waktu ke waktu .

2. Tumor heterogenitas.

Meskipun sebagian besar tumor ganas yang berasal monoklonal , pada saat mereka terbukti secara klinis, sel-sel penyusunnya telah menjadi sangat heterogen. Heterogenitas hasil dari beberapa mutasi yang terakumulasi secara independen dalam sel yang berbeda. Hal ini menyebabkan generasi *subclones*, memiliki masing-masing dengan karakteristik fungsional atau morfologi yang berbeda. Sebuah tumor yang tumbuh cenderung memiliki *subclones* yang mampu bertahan hidup, tumbuh, invasi, dan bermetastasis (*Pathological Website, 2006*).



Gambar 12. Heterogenitas tumor (*Pathological Website, 2006*)

Perbedaan yang terjadi antara hipotesis dengan data hasil statistik penelitian disebabkan oleh beberapa faktor. Adapun salah satu faktor yang turut andil dalam hal ini adalah distribusi jumlah sampel derajat diferensiasi tumor. Hal ini disebabkan karena diferensiasi buruk adenokarsinoma dan karsinoma mucinous (Por & Muc) dari *colon* dan *rectum* memiliki insiden lebih rendah dari kanker organ lain seperti lambung dan kelenjar payudara. Namun tetap memiliki karakteristik diferensiasi buruk, yaitu prognosis buruk, stadium terminal saat diagnosis, perilaku agresif dan tingginya insiden metastasis. Sebagian karena jumlah kasus yang terlalu kecil, beberapa jurnal diferensiasi buruk & mucinous karsinoma kolorektal (CRC) mengenai perubahan genetik dalam karsinogenesis kolorektal, menjelaskan perkembangan tumor sebagai refleksi dari perubahan genetik kumulatif. Hal ini menunjukkan bahwa beberapa gen supresor tumor kehilangan fungsi bertahap mereka dalam urutan tertentu. Oleh karena itu, menurut tahapan karsinogenesis, perubahan genetik seharusnya lebih terakumulasi di differensiasi buruk & karcinoma mucinous yang akan menurunkan survival rate penderita (Kanazawa, *et al.*, 2002). Pada derajat diferensiasi yang tinggi, maka angka bertahan hidup 49 bulan 21,7%, derajat diferensiasi sedang dan baik untuk 60 bulan 58,9% dan perbedaan ini sangat bermakna dengan $p < 0,01$ (Riwanto, *et al.*, 1994). Faktor lain yang dapat mempengaruhi ialah pasien telah mendapatkan terapi kemoterapi atau radioterapi sebelum operasi yang dapat membiaskan hasil dari statistik. Dimana bila mendapatkan kemoterapi berupa 5Fu yang mempunyai