

HUBUNGAN STATUS INSTABILITAS MIKROSATELIT DAN EKSPRESI P53 DENGAN ETIOPATOLOGI ADENOKARSINOMA KOLOREKTAL PADA ORANG INDONESIA DI KELOMPOK USIA KURANG DARI 40 TAHUN

KIKI LUKMAN
BIRGITTA M. DEWAYANI
BETHY S. HERNOWO
BASRUL HANAFI
TRI HANGGONO ACHMAD
SUWANDI SUGANDI

Universitas Padjadjaran/RS Dr. Hasan Sadikin, Bandung
email korespondensi: klukman@surgery.fk.unpad.ac.id

Abstrak

Secara epidemiologik, persentase penderita adenokarsinoma kolorektal (AKK) pada usia ≤ 40 tahun di Indonesia lebih tinggi dibandingkan dengan negara di Eropa Barat, Amerika Utara, dan Asia lainnya, dengan gambaran kliniko-patologi yang berbeda pula. Di negara tersebut, karsinogenesisnya adalah jalur herediter yaitu instabilitas mikrosatelit (IM), sedangkan pada usia >40 tahun disebabkan oleh jalur sporadik yaitu instabilitas kromosom (IK) dengan mutasi gen p53. Untuk mengetahui jalur karsinogenesis dan karakteristik molekuler AKK ≤ 40 tahun pada orang Indonesia, dilakukan penelitian potong lintang yang memeriksa ekspresi gen MLH1 dan MSH2 (status IM), serta ekspresi P53 (status IK) pada kelompok AKK ≤ 40 tahun dan AKK >40 tahun secara imunohistokimia di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung dari Mei 2008–November 2009. Sebanyak 39 penderita AKK terdiri atas 22 AKK ≤ 40 tahun dan 17 AKK >40 tahun, memenuhi kriteria inklusi penelitian ini. Penderita kelompok AKK ≤ 40 tahun menunjukkan 4 IM tinggi, 1 IM rendah, dan 17 IM negatif, disertai oleh 10 status p53 positif dan 12 p53 negatif, sedangkan pada kelompok AKK >40 tahun tidak diperoleh IM tinggi, namun didapat 4 IM rendah dan 13 IM negatif, yang disertai oleh 11 status p53 positif dan 6 p53 negatif. Tidak diperoleh perbedaan pola hubungan IM dan ekspresi mutasi p53 di antara kedua kelompok tersebut (p status IM=0,95; p p53=0,23).

Abstract

Epidemiologically, the percentage of colorectal adenocarcinoma (CRC) in the age group ≤ 40 years old in Indonesia is higher than in the West European, North American and other developed Asian countries with different clinico-pathological features. In the aforementioned countries, the carcinogenesis pathway of this group is hereditary which show high microsatellite instability (MSI), whereas the age group >40 years old is sporadic of which show chromosomal instability (CIN) with the mutation of p53 gene. To elucidate the carcinogenesis pathway with its molecular characteristics of this group among Indonesians, a cross sectional study was conducted by performing the immunohistochemical detection of MLH1 and MSH2 expression (MSI status), and mutated p53 gene expression (CIN) in the CRC group ≤ 40 years old and >40 years old at Dr. Hasan Sadikin Hospital, Bandung, from May 2008 until November 2009. Thirty nine CRC patients, consisting of 22 patients of ≤ 40 years old and 17 patients >40 years old, were eligible for this study. The CRC patients of ≤ 40 years old showed 4 MSI high, 1 MSI low and 17 MSS (microsatellite stable), associated with 10 p53 positive and 12 p53 negative status. In the CRC group of >40 years old, there was no MSI high, but 4 MSI low and 13 MSS were found, associated with 11 p53 positive and 6 p53 negative status. There was no significant difference with regards to the association between MSI status and p53 expression in both groups (p MSI=0.95, p p53=0.23).

Pendahuluan

Adenokarsinoma kolorektal (AKK) merupakan salah satu jenis kanker dengan insidensi tertinggi di berbagai belahan dunia dan cenderung terus meningkat terutama di berbagai negara berkembang di Asia dan Eropa Timur. Di seluruh dunia, AKK menduduki urutan ketiga sebagai kanker yang paling banyak dijumpai pada laki-laki dan kedua pada perempuan, serta urutan keempat sebagai penyebab kematian karena kanker.

Estimasi World Health Organization (WHO) menyatakan kira-kira 1,2 juta kasus baru per tahunnya dilaporkan di seluruh dunia dengan 608.700 kematian setiap tahunnya. Berdasarkan laporan WHO tahun 2002, insidensi AKK di Indonesia sebesar 17,8 per 100.000 penduduk, dan ini menunjukkan peningkatan insidensi dibandingkan dengan berbagai laporan sebelumnya.

Berbagai penelitian di banyak negara dilaporkan bahwa penyakit ini lebih dari 90% didiagnosis pada usia >55 tahun. Jalur karsinogenesis pada kelompok usia tersebut adalah sporadik yang disebabkan oleh berbagai faktor risiko lingkungan dan biologik. Persentase AKK pada kelompok usia ≤ 40 tahun bervariasi mulai dari 0,4% sampai dengan 35,6%. Pada kelompok tersebut ditemukan jenis AKK herediter yang terutama disebabkan oleh *sindrom hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma* (HNPCC) atau *familial adenomatous polyposis* (FAP). Sebagai literatur di negara Eropa dan Amerika Utara melaporkan persentasenya yang lebih rendah dibandingkan dengan di negara Asia, yaitu 2–8%. Di Indonesia, persentase AKK yang berusia ≤ 40 tahun lebih tinggi jika

dibandingkan dengan negara di Eropa dan Amerika Utara. Pada tahun 1995–2004 persentase AKK pada kelompok tersebut 15–54,5%. Selain perbedaan tingkat persentase tersebut, ternyata karakteristik klinik-opatologi pada kelompok penderita tersebut juga menunjukkan perbedaan, yaitu mayoritas di kolon kiri dan rektum, serta jenis histopatologinya berupa *signet ring cells* (data belum dipublikasikan).

Pada jalur karsinogenesis sporadik, teori yang dianut adalah sekuens adenoma-karsinoma yang meliputi proses akumulasi mutasi gen yang berbentuk instabilitas kromosom (IK) dan dimulai dari mutasi pada gen adenomatous polyposis coli (APC), K-ras, *deleted colorectal cancer* (DCC) dan diakhiri oleh mutasi gen p53. Berbeda dengan jalur sporadik, perubahan yang terjadi pada jalur herediter berupa instabilitas mikrosatelit (IM) yang disebabkan oleh mutasi *gen mismatch repair* (MMR) sehingga terjadi kegagalan mekanisme reparasi gen. Berbagai jenis gen yang berperan pada mekanisme ini yaitu gen MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, MSH3, dan MSH6. Bentuk lain jalur herediter yaitu jalur adenoma karsinoma, namun mutasi gen APC-nya bersifat herediter. Meskipun demikian, jalur IM ditemukan pula pada 15% kasus AKK sporadik melalui mutasi terutama pada gen MSH1 dan MLH2 oleh karena hipermetilasi pada daerah promotor CpG Island.

Penelitian klasifikasi genetik molekuler di negara lain menunjukkan bahwa status IM tinggi akan berasosiasi dengan rendahnya mutasi gen p53 pada AKK <40 tahun, dan berlaku sebaliknya pada kelompok AKK >40 tahun. Oleh sebab itu, untuk memberi penjelasan lebih lanjut tentang jalur karsinogenesis dan klasifikasi molekuler pada penderita AKK orang Indonesia di bawah usia 40 tahun, dilakukan penelitian hubungan IM dengan ekspresi mutasi gen p53 terhadap terjadinya AKK pada kelompok usia tersebut dibandingkan dengan AKK >40 tahun. Hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk skrining, surveilans, dan manajemen kemoterapi, serta penetapan prognosis AKK, khususnya di Indonesia.

Metode

Subjek penelitian adalah penderita AKK yang merupakan orang Indonesia asli, berdomisili di Indonesia, dan berusia >14 tahun, serta mendapat perawatan bedah di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin (RSHS), Bandung. Penderita AKK yang mengalami rekuren lokal setelah terapi bedah, menjalani radioterapi atau kemoterapi preoperatif, serta diketahui memiliki riwayat menderita FAP coli tidak dimasukkan ke dalam penelitian ini.

Desain penelitian ini penelitian potong lintang yang mempelajari pola hubungan asosiatif status IM dan ekspresi mutasi gen p53 (protein P53) pada AKK berusia ≤ 40 tahun dan AKK berusia >40 tahun, kemudian membandingkan kedua kelompok tersebut dengan cara uji statistik chi-kuadrat. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program *statistical package for the social sciences* (SPSS) versi 16.0.

Berdasarkan perhitungan jumlah sampel untuk perbedaan proporsi dua kelompok, dengan tingkat kemaknaan (α)=0,05 dan kekuatan penelitian (*power*) 80%, serta proporsi standar untuk ekspresi mutasi gen p53 masing-masing kelompok 0,85 dan 0,15, maka diperoleh jumlah sampel minimal sebanyak total 29 orang.

Instabilitas mikrosatelit dideteksi dengan pemeriksaan imunohistokimiat terhadap ekspresi hMLH1 dan hMSH2 dengan antibody rabbit polyclonal dari Santa Cruz Biotechnology. Pulasan terhadap protein MMR dilakukan dengan anti - MLH1 (N-20, Santa Cruz, Biotech. Inc.) dan anti-MSH2 (3A2B8C, Santa Cruz, Biotech. Inc.). Sebagai kontrol positif yaitu jaringan kolon normal. Pemeriksaan imunohistokimia dengan metode kompleks avidin-biotin-peroksidase dan *rabbit monoclonal antibody* (3H2805, Santa Cruz, Biotech. Inc.) dilakukan untuk mendeteksi ekspresi mutasi gen p53.

Data demografi yang diteliti yaitu usia dan jenis kelamin. Faktor patologik yang diteliti yaitu jenis varian histopatologi, diferensiasi histologi, dan lokasi tumor primer. Semua data diperoleh melalui wawancara langsung dengan penderita dan hasil pemeriksaan klinis serta histopatologi setelah pengelolaan bedah dilakukan.

Pengukuran ekspresi gen diperoleh dari analisis mikroskopis oleh dua orang spesialis patologi anatomi. Stroma jaringan dan epitelium normal atau folikel limfe dipakai sebagai kontrol internal pada waktu menganalisis MLH1 dan MSH2. Ekspresi dinyatakan sebagai positif kuat (++=>40%) atau lemah (+=20–40%), negatif dengan kontrol internal positif (0/+) dan negatif meragukan (bila baik tumor maupun kontrol internal kontrol muncul negatif (0/0), dan bila kontrol internal lebih kuat dari sel-sel tumor yang negatif diberi skor (+/++). Skor penilaian ekspresi protein p53 ditetapkan melalui daerah pewarnaan p53 tertinggi pada inti sel. Kira-kira 1.000 sel dihitung pada daerah tumor yang paling agresif. Pewarnaan dapat diidentifikasi sebagai warna coklat pada nukleus dengan distribusi fokal atau difus. Dianggap negatif apabila ≤ 10% sel-sel kanker yang terwarnai, sedangkan bila >10% dianggap positif.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan tujuan penelitian, kriteria inklusi, dan eksklusi penelitian ini, berhasil diperoleh 39 orang subjek penelitian yang dapat dianalisis berdasarkan urutan kedatangan dan pengelolaan di Divisi Bedah Digestif, RSHS, Bandung dari bulan Mei 2008–Desember 2009.

Karakteristik subjek penelitian dari 39 penderita AKK, diperoleh 21 orang laki-laki dan 18 orang perempuan. Kelompok usia ≤ 40 tahun terdapat sebanyak 22 orang dan usia >40 tahun sebanyak 17 orang. Untuk lokasi tumor primer ditemukan tumor yang terbanyak berturut-turut yaitu rektum, kolon distal, dan proksimal. Berdasarkan varian histopatologi tumor yang terbanyak berturut-turut, adenokarsinoma berdiferensiasi baik, sedang (moderat), dan buruk adenokarsinoma musinosa, dan *signet ring cell* (Tabel 1).

hanya 4 kasus dengan IM positif kuat (Gambar 1). Untuk ekspresi mutasi gen p53, terdapat sebanyak 21 penderita dengan ekspresi p53 yang positif dan 18 penderita dengan ekspresi p53 yang negatif (Gambar 1 dan 2).

A

B

C

Pada kelompok usia >40 tahun, IM terdapat pada 4 kasus dengan status positif lemah dan 13 kasus dengan status negatif (MSS). Pada kelompok penderita AKK ≤40 tahun terdapat 4 penderita dengan status IM positif kuat, 1 penderita dengan positif lemah, dan sisanya 17 kasus dengan IM negatif. Melalui uji chi-kuadrat, tidak diperoleh perbedaan bermakna di antara kedua kelompok tersebut (Tabel 3). Pada kelompok penderita AKK berusia >40 tahun ditemukan sebanyak 11 penderita dengan ekspresi p53 positif dan sebaliknya terdapat 6 penderita dengan ekspresi p53 negatif. Pada AKK kelompok usia ≤ 40 tahun ditemukan sebanyak 10 penderita dengan ekspresi p53 positif dan sebanyak 12 penderita tidak ditemukan ekspresi mutasi gen p53. Hasil uji chi-kuadrat tidak menunjukkan perbedaan proporsi yang bermakna di antara kedua kelompok tersebut (Tabel 3).

Secara uji statistik tidak menunjukkan perbedaan bermakna pada lokasi tumor primer dengan jenis histopatologi antara penderita AKK ≤ 40 tahun dibandingkan dengan penderita AKK >40 tahun (Tabel 2).

Uji analisis hubungan asosiatif dengan chi-kuadrat pada tingkat kepercayaan 95%, yang membandingkan sifat hubungan proporsi status IM dengan ekspresi gen p53 pada kedua kelompok penderita tersebut, secara statistik tidak terdapat perbedaan bermaknadi antara keduanya (Tabel 4).

Dari sebanyak 39 sediaan yang diperiksa, diperoleh hasil sebanyak 30 kasus dengan status mikrosatelit stabil (MSS), 5 kasus dengan IM positif lemah dan

Subjek penelitian ini menunjukkan penderita AKK dengan jenis kelamin laki-laki sedikit lebih banyak dibandingkan dengan perempuan yaitu dengan rasio 1,16:1. Rasio ini mendekati rasio data WHO yaitu laki-laki sedikit lebih banyak daripada wanita dengan perbandingan 19,4 dan 15,3 per 100.000 penduduk atau rasio 1,26:1. Dengan demikian, dapat disimpulkan rasio laki-laki : perempuan pada penderita AKK pada bangsa Indonesia tidak terdapat perbedaan dengan negara lain.

Untuk proporsi kelompok usia, maka pada subjek penelitian ini terlihat kelompok penderita AKK yang berusia ≤ 40 tahun memiliki proporsi lebih besar daripada yang berusia > 40 tahun. Meskipun hal ini sangat berbeda dengan berbagai temuan dari penelitian sebelumnya, baik di Eropa dan Amerika Utara, maupun berbagai publikasi sebelumnya di Indonesia, tidak dapat segera disimpulkan bahwa pada populasi terjangkau kami memiliki proporsi yang lebih tinggi. Lebih tingginya proporsi kelompok tersebut dapat disebabkan secara insidental oleh pola rekrutmen penderita konsekutif dan jumlah penderita yang dibatasi oleh kebutuhan sampel penelitian ini. Oleh karena itu, belum dapat mewakili rasio penderita AKK kedua kelompok tersebut pada populasi sesungguhnya. Pada berbagai publikasi di negara Eropa dan Amerika Utara, serta Asia, persentase pada kelompok usia tersebut adalah 2–8%, sedangkan di berbagai kota di Indonesia 15–54,5%. Meskipun demikian, temuan yang diperoleh pada penelitian ini telah memiliki kecenderungan yang sama dengan laporan penelitian lain di Indonesia, bahkan memberikan petunjuk peningkatan insidensi.

Gambaran histopatologi pada kelompok usia ≤ 40 tahun di dalam penelitian ini menunjukkan gradasi dan varian histologi yang berbedadengan berbagai publikasi dari berbagai negara, yaitu lebih banyak varian *musinous*, *signet ring cell*, diferensiasi buruk lebih jarang ditemukan dan lokasi terutama pada kolon kanan. Uji statistik menunjukkan bahwa kelompok AKK ≤ 40 tahun pada penelitian ini tidak memiliki karakteristik histopatologi yang berbeda dengan kelompok AKK > 40 tahun. Lokasi tumor primer pada subjek penelitian ini sangat dominan pada rektum dengan persentase kolon kanan dan kiri yang lebih kecil. Hal ini berbeda dengan di kebanyakan negara Eropa dan Amerika Utara yang distribusi lokasi tumornya *caecum* dan *kolon ascendens* sebanyak 22%, kolon *transversum* 11%, *kolondesendens* 6%, dan *rekto-sigmoid* 55%, serta sisanya di kedua fleksura sebesar 6%. Meskipun demikian, pada beberapa publikasi terakhir di banyak negara Eropa dan Amerika Utara insidensi tumor pada kolon kanan semakin meningkat. Temuan ini memperkuat dugaan bahwa kemungkinan besar para penderita AKK dengan usia ≤ 40 tahun memiliki jalur karsinogenesis yang sama dengan jalur AKK sporadik. Oleh karena itu, kami melakukan analisis status molekuler pada kelompok ini dilihat dari ekspresi protein berbagai gen yang berperan dalam karsino-genesisnya.

Secara keseluruhan subjek penelitian ini menunjukkan mayoritas (77%) dengan status MSS atau IM negatif. Pada kelompok penderita AKK ≤ 40 tahun masih ditemukan status IM positif kuat (18,2%), meskipun mayoritas masih menunjukkan status IM yang negatif. Berbeda dengan kelompok tersebut, pada penderita AKK dengan usia >40 tahun hanya ditemukan IM positif lemah saja (23,5%) dengan tetap mayoritas menunjukkan status IM yang negatif. Temuan ini lebih tinggi dari pada yang disebutkan di berbagai literatur yaitu IM ditemukan pada 15% penderita AKK > 50 tahun. Selain itu, hasil uji analisis statistik juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna status IM pada kedua kelompok tersebut. Meskipun demikian, sudah terdapat kecenderungan bahwa penderita AKK dengan IM positif kuat akan berhubungan dengan status P53 yang negatif (66%), dan sebaliknya mayoritas penderita (90%) dengan mikrosatelit stabil (IM negatif) menunjukkan status P53 yang positif. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pada kedua kelompok tersebut diperoleh tingkat proporsi ekspresi gen *p53* yang lebih tinggi disertai dengan tingkat proporsi IM positif yang rendah.

Walaupun masih terdapat kontroversi, bentuk IM rendah (positif lemah) adalah bentuk fenotipe yang berbeda dengan MSS, yaitu berasosiasi dengan tingkat harapan hidup yang lebih rendah pada AKK stadium III, metilasi dan kehilangan *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)*, dan *CpG island methylator phenotype (CIMP)* yang rendah. Sebagian berpendapat IM rendah hanyalah berbeda secara kuantitatif dengan MSS, sedangkan secara kualitatif jalur genetiknya tetap sama, yaitu jalur sporadik. Oleh karena itu, mereka menganggap keduanya memiliki fenotipe yang sama dengan kelompok IK atau MSS atau jalur sporadik yang disebabkan oleh mutasi gen *p53*. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini, secara mayoritas jalur *karsinogenesis* kedua kelompok tersebut berada pada jalur sporadik. Pada para penderita AKK dengan status IM yang positif kuat memiliki korelasi negatif dengan ekspresi mutasi gen *p53*. Pada penelitian ini semua penderita yang ditemukan dengan IM positif kuat berusia ≤ 40 tahun dan tidak menunjukkan ekspresi mutasi gen *p53*, serta hanya satu penderita yang lokasi tumornya di kolon proksimal. Walaupun dari anamnesis tidak ditemukan data yang sesuai dengan kriteria Amsterdam maupun Bethesda, besar kemungkinan penderita tersebut termasuk dalam kelompok *herediter*.

Persentase penderita AKK dengan ekspresi mutasi gen *p53* pada subjek penelitian ini cukup rendah jika dibandingkan dengan temuan lain di berbagai penelitian yaitu berkisar 70–85%. Temuan ini dapat disebabkan oleh metode deteksi imunohistokimia yang masih kurang sensitif untuk mendeteksi *wild type-mutant p53* dan kriteria standar yang berbeda di antara berbagai penelitian. Selain itu, mungkin pula terdapat jenis AKK yang berada pada jalur hipermetilasi promotor pada pulau CpG gen *MLH1*, dan gen-gen MMR lainnya, atau pun pada jalur *base excision repair* -

defect pada gen MYH yang berhubungan dengan poliposis. Oleh karena itu, untuk memastikannya perlu analisis lebih lanjut untuk berbagai mutasi gen tersebut pada tingkat *deoxyribonucleic acid* (DNA) dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing*, serta teknik *MethylLight* dengan panel khusus *CpG island methylator phenotype* (CIMP). Temuan yang sangat spesifik pada penelitian ini yaitu tidak ditemukan perbedaan status mutasi gen *p53* yang signifikan di antara kedua kelompok usia yang berbeda dan korelasi negatif dengan status IM, sehingga keduanya dapat disimpulkan berada pada jalur karsinogenesis sporadik.

Simpulan dan Saran

Para penderita adenokarsinoma kolorektal orang Indonesia yang berusia ≤ 40 tahun menunjukkan tingginya tingkat proporsi ekspresi mutasi gen *p53* yang berasosiasi dengan rendahnya tingkat proporsi IM. Kelompok penderita ini memiliki proporsi yang relatif tinggi jika dibandingkan dengan kelompok yang sama di berbagai negara maju dan berkembang lainnya. Meskipun demikian, kelompok ini tetap memiliki gambaran genetik molekuler dan klinikopatologi yang tidak berbeda dengan penderita adenokarsinoma kolorektal >40 tahun, sehingga dapat disimpulkan bahwa keduanya berada pada jalur karsinogenesis sporadik.

Oleh karena tingginya persentase dan terus meningkatnya insidensi penderita adenokarsinoma kolorektal ≤ 40 tahun di Indonesia dan menunjukkan karakteristik jalur karsinogenesis sporadik, maka pada dasarnya pengelolaan kelompok usia tersebut sama dengan kelompok penderita adenokarsinoma kolorektal > 40 tahun, namun harus disertai upaya penyaringan dan deteksi dini pada usia yang lebih muda. Selain itu, perlu dilakukan studi klasifikasi molekuler yang lebih lengkap dengan teknik pemeriksaan pada PCR dan *sequencing*, serta teknik *MethylLight*, sehingga dapat bermanfaat untuk menilai biologi tumor, prognosis, dan resistensi terhadap kemoterapi.

Daftar Pustaka

- Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(8):1893–907.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence. Dalam Worldwide IARC Cancer Base, vol 5, version 2.0*. Lyon: IARC Press, 2004.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures, 2002*. New York: American Cancer Society Inc. *Surveillance Research 2002*; 02-250M No 508.02 :20–6.
- National Cancer Institute. 2004. *Rectal Cancer*. Tersedia dari: www.cancer.gov. [diunduh tanggal 27 Maret 2008].
- O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. *Colorectal cancer in*

the young. *Am J Surg* 2004;187:343–8.

- Church JM, Casey G. *Molecular Genetics and Colorectal Neoplasia: A Primer for the Clinician*. Edisi ke-2, Kluwer Academic Publishers, Boston, 2004:84–5.
- Lin JT, Wang WS, Yen CC, Liu JH, Yang MH, Chao TC, dkk. *Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20(6):900–5.
- Riwanto I. *Skrining dan surveilans karsinoma kolo-rektal. Perpaduan antara risiko kejadian penyakit terhadap biaya yang diperlukan*. *Proceeding of First IKABDI Colorectal Week*, 2002.
- Church JM, Casey G. *Molecular genetics and colorectal neoplasia: A primer for the clinician*. Edisi ke-2, Kluwer Academic Publishers, Boston, 2004:70–4.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. *Molecular basis of colorectal cancer*. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449–60.
- Boland CR, Goe A. *Microsatellite instability in colorectal cancer*. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073–87.
- Ogino S, Goel A. *Molecular classification and correlates in colorectal cancer*. *J Mol Diagn*. 2008;10:13–27.
- Shah AB, Sarfati D, Blakely T, Atkinson J, Dennett ER. *Trends in colorectal cancer incidence rates in New Zealand, 1981–2004*. *ANZ J Surg*, 2012;82(4):258–64.
- Tomlinson I, Halford S, Aaltonen L, Hawkins N, Ward R. *Does MSI-low exist?* *J. Pathol*. 2002;197(1):6–13.
- Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Suemoto Y, Meyerhardt JA, Fuchs CS. *Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer*. *Gut*. 2007;56(11):1564–71.
- Moran A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, dkk. *Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance*. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2(3):151–8.