

Single Nucleotide Polymorphism Promoter -765g/C Gen Cox-2 Sebagai Faktor Risiko Terjadinya Karsinoma Kolorektal

Promoter Single Nucleotide Polymorphism -765g/C Cox-2 Gene As a Risk Factor for Colorectal Carcinoma

Triwani¹, Irsan Saleh²

1. Departemen Biologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
2. Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

Alamat Korespondensi: tri_wani@yahoo.co.id

Abstrak

Karsinoma kolorektal (KKR) merupakan keganasan yang berasal dari transformasi neoplastik sel-sel epitel kolon dan rektum, menempati urutan ketiga terbanyak dari seluruh kanker di seluruh dunia. Berbagai perubahan DNA dapat terjadi akibat paparan dengan lingkungan dan karsinogen. DNA yang gagal berpasangan menimbulkan instabilitas genetik, mutagenesis, dan kematian sel, disebut sebagai *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Polimorfisme adalah perubahan atau mutasi pada gen yang tidak menimbulkan perubahan struktur protein hanya mengakibatkan variasi fungsi protein, tidak bermanifestasi klinis, hanya bisa menentukan kerentanan terhadap penyakit. Jenis penelitian ini adalah deskriptif observasional pada gen COX-2 dengan metode PCR-RFLP. Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah case series, dilakukan di Laboratorium Klinik RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang selama 4 bulan, dari bulan Mei sampai dengan November 2012. Terdapat empat puluh (40) orang subjek penelitian yang merupakan penderita KKR, semuanya berasal dari seluruh etnis yang berdomisili di Sumatera Selatan dan bersedia ikut serta dalam penelitian. Penderita karsinoma kolorektal yang berjenis kelamin laki-laki (52,5%) lebih banyak daripada wanita (47,5%), lokasi karsinoma pada daerah kolon (25%) lebih banyak daripada daerah rektum (75%), dan penderita dengan adenokarsinoma (77,5%) merupakan jenis terbanyak diikuti musinus adenokarsinoma (17,5%) dan adenoskuamous karsinoma (5%). Distribusi genotip CC (mutan) sebanyak 10%, genotip GC (heterozygot) sebanyak 10%, dan, genotif GG (normal) sebanyak 80%. Sedangkan Distribusi alel C (mutan) sebanyak 16% dan alel G (normal) sebanyak 84%. Penelitian ini terbatas pada identifikasi polimorfisme gen COX2 pada kasus KKR, tidak melihat hubungan atau pengaruh polimorfisme gen COX-2 terhadap kejadian KKR. Perlu dilakukan wawancara lebih lanjut terhadap pasien mengenai suku, etnis, riwayat keluarga. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hubungan polimorfisme promoter -765G/C Gen COX-2 dengan kejadian karsinoma kolorektal.

Kata kunci: Karsinoma kolorektal, gen COX2, polimorfisme, promoter -765G/C Gen COX-2

Abstract

Colorectal carcinoma (CRC) is a malignancy derived from neoplastic transformation of epithelial cells of the colon and rectum, ranks third highest of all cancers worldwide. Various DNA changes may occur due to exposure to the environment and carcinogens. DNA failed paired cause genetic instability, mutagenesis, and cell death, known as single nucleotide polymorphisms (SNPs). Polymorphism is a change or mutation in a gene that does not cause changes in the protein structure may lead to variations in protein function, no clinically manifest, can only determine susceptibility to the disease. This research is a descriptive observational on COX-2 gene by PCR-RFLP. The research design used in this study were case series, conducted in the Clinical Laboratory dr. Mohammad Hoesin Palembang for 4 months, from May to November 2012. There are forty (40) persons who are research subjects TRC patients, from all ethnic domiciled in South Sumatra and willing to participate in the study. Patients with colorectal carcinoma were male sex (52.5%) more than women (47.5%), the location of the area of colon carcinoma (25%) more than the area of the rectum (75%), and patients with adenocarcinoma (77.5%) were the most followed mucinous adenocarcinoma (17.5%) and adenoskuamous carcinoma (5%). CC genotype distribution (mutant) as much as 10%, GC genotype (heterozygous) as much as 10%, and, genotype GG (normal) as much as 80%. While the distribution of the C allele (mutant) as much as 16% and allele G (normal) as much as 84%. This study is limited to the identification of COX2 gene polymorphism in the case of the CRC, not to see relationships or effect of COX-2 gene polymorphism on the incidence of CRC. Need to do more interviews to patients regarding race, ethnicity, family history. Further research needs to be conducted to determine the relationship of the promoter polymorphism -765G/C gene COX-2 with incident colorectal carcinoma.

Keywords: Colorectal carcinoma, COX 2 gene, polymorphism, promoter -765G / C gene COX-2

Pendahuluan

Karsinoma kolorektal (KKR) merupakan keganasan yang berasal dari transformasi neoplastik sel-sel epitel kolon dan rektum, menempati urutan ketiga terbanyak dari seluruh kanker di seluruh dunia.^{1,2} WHO melaporkan insiden KKR diperkirakan 9,4% dari semua kasus kanker di seluruh dunia.

Di Amerika Serikat KKR merupakan penyebab kematian kedua dengan perkiraan kasus baru sebanyak 147.000 kasus dan angka kematian 57.000 orang pada tahun 2004.³ Berdasarkan data di Departemen Kesehatan Republik Indonesia, karsinoma kolorektal tercatat menempati urutan ke lima dari keseluruhan kanker di Indonesia, yaitu sebanyak 1,8 per 100.000 penduduk pada tahun 2002, dilaporkan terjadi peningkatan jumlah kasus tiap tahunnya.² Hal ini menjadikan KKR merupakan masalah yang sangat penting dalam kesehatan masyarakat.

Perkembangan KKR merupakan interaksi antara faktor lingkungan dan faktor genetik. Sebanyak 10% kejadian KKR mengikuti pola genetik yang mencakup sporadik sebanyak 70%, dan familial sebanyak 20%.^{2,4} Telah banyak penelitian faktor resiko terjadinya KKR, akibat diet dan gaya hidup. Namun beberapa penelitian gagal membuktikan keterkaitan ini, timbul dugaan bahwa karsinoma kolorektal adalah akibat multifaktorial dan multiproses, antara lain akibat perubahan genetika dan beberapa jalur-jalur biologis.^{5,6}

Di dalam suatu sel dikenal adanya *deoxyribonucleic acid* (DNA). DNA merupakan bahan genetik tempat penyimpanan informasi biologis dalam bentuk kode-kode genetik. Berbagai mekanisme pertahanan melawan perkembangan kanker melibatkan berbagai seri protein gen pengkode yang terlibat dalam gabungan metabolisme dan reduksi bahan-bahan yang potensial memicu toksik/karsinogenik serta perbaikan lesi DNA (*DNA repair*)⁽⁵⁾

DNA ini terus-menerus diserang oleh agen eksogen dan endogen yang menyebabkan modifikasi atau kerusakan DNA. Proses perbaikan DNA ini dikenal dengan perbaikan DNA (*DNA repair*). Jika lesi DNA yang tersisa tidak diperbaiki, mereka dapat menyebabkan mutagenesis dan oncogenesis. Dengan demikian, perbaikan DNA merupakan garis pertama pertahanan melawan kanker. Variasi dalam perbaikan DNA bisa disebabkan oleh karena sering terjadi polimorfisme dalam gen perbaikan DNA, sehingga mungkin memiliki dampak pada kerentanan genetik individu untuk menjadi kanker.

Berbagai perubahan DNA dapat terjadi akibat paparan dengan lingkungan dan karsinogen. DNA yang gagal berpasangan dapat menimbulkan instabilitas genetik, mutagenesis, dan kematian sel. Kejadian tersering yang menyebabkan mutasi pada nukleotida ini disebut sebagai *single nucleotide polymorphisms* (SNPs).

Polimorfisme adalah perubahan atau mutasi pada gen yang tidak menimbulkan perubahan struktur protein melainkan hanya mengakibatkan variasi pada fungsi protein. Polimorfisme tidak bermanifestasi klinis, tetapi bisa menentukan kerentanan terhadap penyakit.⁷ Dampak polimorfisme adalah terjadi perubahan kerentanan suatu populasi terhadap penyakit. Polimorfisme yang terjadi akan terus diturunkan sehingga frekuensi polimorfisme pada setiap etnis dapat berbeda-beda. SNPs dapat dijadikan sebagai biomarker untuk identifikasi kepekaan terhadap kanker.⁷

Beberapa penelitian menduga adanya SNPs pada promotor enzim siklooksigenase-2 (COX-2) yang dikenal sebagai *prostaglandine syntetase* (PTGSs),⁸ yaitu enzim yang berperan dalam mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin pada proses inflamasi. Dua gen kunci yang berperan dalam proses inflamasi yakni, siklooksigenase-2 (COX-2) dan *nuclear kappaB* (NF-kB), yang berperan menyediakan link mekanis antara peradangan dan kanker yang menjadi target untuk *chemo prevention* khususnya pada KKR.

Ekspresi COX-2 rendah pada jaringan dan dapat meningkat karena rangsangan mitogenik dan proses inflamasi. Peningkatan ekspresi dari COX-2 berhubungan dengan perkembangan kanker melalui proses inflamasi, angiogenesis, sistem imun, dan proliferasi sel.⁸⁻¹² COX-2 secara normal sebagian besar tidak dijumpai pada sel dan jaringan. Ekspresi dari COX-2 di pacu oleh sel tumor premalignant dan malignan pada berbagai organ seperti kolorektal, paru, payudara, prostat, kandung kemih, gaster dan esophagus.⁸⁻¹² Overekspresi dari COX-2 berhubungan terhadap peningkatan proliferasi sel, peningkatan angiogenesis, menghambat apoptosis, stimulasi invasi dan supresi respon imun. Walaupun COX-2 banyak terlibat dalam karsinogenesis pada berbagai jaringan dan organ, namun peranannya dalam COX-2 masih dalam perdebatan.^{18,19,20}

Karsinoma kolorektal (KKR) merupakan kanker ganas yang dijumpai pada kolon dan rektum. Dipandang dari segi biologi molekuler, KKR merupakan kanker yang cukup unik karena mengalami transformasi sebagai akibat terjadinya akumulasi perubahan genetik dan epigenetik. Pada KKR juga dijumpai adanya perubahan sekuen epitel normal menjadi adenokarsinoma.⁶

Berbagai hipotesis telah dikemukakan mengenai hubungan polimorfisme gen COX-2 dengan KKR yang hasilnya menunjukkan inkonsistensi terhadap pengaruh COX-2 dengan resiko KKR. Penelitian Yang dkk (2009) menemukan adanya penurunan resiko terkena KKR pada polimorfisme dengan genotip COX-2-1195A/A dibandingkan dengan 1195G/G dan genotip -765G/C dibandingkan dengan genotif -765G/G.¹³ Penelitian Ulrich dkk (2005) pada populasi di Amerika menemukan polimorfisme -765G/C pada COX-2 menurunkan resiko terjadinya KKR.¹⁴ Sedangkan Tan dkk (2007) yang

melakukan penelitian pada populasi Cina, etnik *Han Chinese*, menemukan peningkatan resiko KKR pada polimorfisme genotip -765G/C.¹⁵ Hasil yang berbeda ini mengindikasikan bahwa COX-2 dengan polimorfisme -765G/C berkaitan dengan kejadian KKR juga dipengaruhi oleh ras dan kondisi tertentu pada populasi yang beresiko. Penelitian mengenai hubungan varian-varian gen promoter COX-2 pada penderita KKR menjanjikan sarana baru bagi klinisi untuk mengevaluasi kerentanannya sebagai faktor predisposisi genetik.

Penelitian pada populasi Melayu di Indonesia terhadap polimorfisme promoter -765G/C pada COX-2 hingga saat ini belum pernah dilakukan. Beberapa penelitian menunjukkan inkonsistensi hasil mengenai pengaruh polimorfisme 765G/C pada COX-2 terhadap resiko terjadinya KKR. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi polimorfisme promoter -765G/C Gen COX-2 pada kasus karsinoma kolorektal yang dilakukan di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Masalah yang diteliti adalah, gambaran polimorfisme promoter -765G/C gen COX-2 pada kasus karsinoma kolorektal di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang?

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengidentifikasi adanya polimorfisme promoter -765G/C gen COX-2 pada penderita karsinoma kolorektal di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Secara khusus adalah untuk Mengidentifikasi karakteristik penderita karsinoma kolorektal; mengetahui distribusi genotip *GG*, *GC*, dan *CC* promoter-765 gen COX-2; dan mengetahui distribusi alel G dan C promoter-765 gen COX-2 pada penderita karsinoma kolorektal di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Metode

Jenis penelitian ini adalah deskriptif observasional pada gen COX-2 dengan metode PCR-RFLP. Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah case series, dilakukan di Laboratorium Klinik RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

Populasi target dalam penelitian ini yaitu penderita KKR yang bertempat tinggal di Sumatera Selatan, sedangkan populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah penderita KKR yang datang berobat ke RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Sampel dikumpulkan dari populasi penelitian yang memenuhi kriteria inklusi, yaitu pasien yang didiagnosis pasti KKR oleh dokter spesialis bedah berdasarkan pemeriksaan histopatologi dan berobat ke RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang pada periode Januari-Juni 2011, serta bersedia mengikuti penelitian, yang dinyatakan dengan menandatangani surat persetujuan atas dasar kesadaran (*informed consent*).

Pengambilan Darah

Sampel darah diambil melalui punksi vena antecubiti sebanyak 2 ml dimasukkan kedalam tabung yang mengandung antikoagulan *ethylene diamine tetra acid* (EDTA) untuk ekstraksi DNA dan PCR.

Isolasi DNA

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang diperlukan untuk isolasi DNA darah adalah tabung sentrifugasi 15 ml steril, rak tabung, pipettor (Biohit *Proline*[®] PIPETTE) dengan berbagai ukuran (10-100 μ l dan 100-1000 μ l), pipet tip untuk volume 1000 μ l dan 100 μ l, freezer -20°C, alat vorteks (*Stuart Scientific Autovortex SA6*), *waterbath* (Neslab RTE III), mesin inkubator, *ice bath*, mesin sentrifugasi (*eppendorf centrifuge 5702 R*), tabung eppendorf 1,5 ml, serta kertas absorban atau *tissue*.

Bahan-bahan yang diperlukan untuk isolasi DNA dari darah adalah Posfat Buffer Saline (PBS) pH 7,4, Safonin 0,5% dalam PBS, dan chelex 20% dalam ddH₂O.

b. Cara Kerja

Darah diambil sebanyak 200 μ l menggunakan pipettor dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml. Kemudian darah tersebut dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 1 ml/1000 μ l lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan ditambahkan kembali PBS pH 7,4 sebanyak 1000 μ l lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Kegiatan ini diulangi sebanyak 2 kali. Selanjutnya supernatan dibuang, lalu ditambahkan saponin (0,5% saponin dalam PBS dicampur dengan baik menggunakan vortek kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit). Campuran ini diinkubasi pada suhu 20°C selama 1 malam, campuran kemudian divorteks dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Lalu dicuci kembali sebanyak 3 kali dengan PBS pH 7,4 1000 μ l dan sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan ditambahkan 50 μ l chelex (20% dalam ddH₂O pH 10,5) serta 100 μ l ddH₂O. Kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. DNA berada pada bagian supernatan (*DNA containing water*) dipindahkan ke dalam tabung steril sebanyak 200 μ l dan disimpan pada suhu -20°C.

Desain Primer yang Spesifik

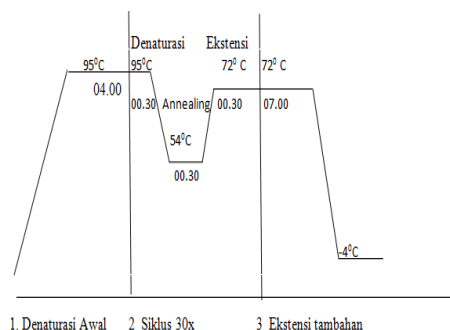
Pemilihan primer dengan memperhatikan syarat suatu primer dengan memperhatikan letak polimorfisme promoter -765G/C yang dapat dikenali oleh enzim restriksi endonuklease *HhaI* (5'...GCGC...3' dan 3'...GCGC...5'). Pasangan primer terpilih mempunyai sekuen 5' TATTATGAGGAGATTTACCTTTCGC-3' sebagai primer upstream, sedangkan primer downstream adalah 5' GCTAAG TTGCTTTCAACAGAAGAAT -3'. Spesifisitas kedua primer dikonfirmasi dengan melakukan 'BLAST' melalui website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Hasil konfirmasi menunjukkan kedua primer spesifik untuk amplifikasi gen COX-2.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA genom yang diperoleh dari hasil isolasi, dengan menggunakan teknik PCR, fragmen-fragmen DNA genom yang ingin dianalisa dapat ditingkatkan kuantitasnya dengan cara amplifikasi secara *in vitro* dalam waktu singkat dengan menggunakan pasangan primer oligonukleotida sintetik yang membatasi daerah yang akan diperbanyak. Pada penelitian ini digunakan sepasang primer oligonukleotida untuk deteksi polimorfisme titik. Komposisi campuran dengan volume total 25 µl yang digunakan saat melakukan PCR adalah PCR *mix Go Taq* (Promega, USA) yang terdiri dari 12,5 µl dNTPs (campuran dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl₂ dan *Taq Polymerase*, 7,5 µl ddH₂O, dan 3 µl DNA cetakan (*template*), serta primer oligonukleotida *reverse* (R) dan *forward* (F) masing-masing 1 µl. Untuk lebih jelas mengenai primer yang dipakai, panjang primer, dan produk PCR, pasangan Primer yang digunakan untuk identifikasi polimorfisme titik promoter-765 gen COX-2 G/C:

- Primer: 765 Forward, Sekuen: 5'-TATTATGAGGAGATTTACCTTTCGC-3'
- Primer; 765 Reverse, Sekuen: 5'-GCTAAGTTGCTTTCAACAGAAGAAT-3'

PCR dilakukan pada mesin *i-cycler* (*Biorad*). Prinsip dasar amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR adalah sintesis DNA *in vitro* secara bireksional berulang melalui ekstensi sepasang primer oligonukleotida yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida dari kedua rantai DNA yang diamplifikasi. Proses sintesis ini berlangsung dalam tiga tahap reaksi yang berulang sebanyak 30 siklus pada suhu berbeda yaitu: reaksi *denaturasi* pada suhu diatas 95°C untuk memisahkan rantai ganda menjadi dua rantai tunggal, reaksi *annealing* yaitu menyatunya kembali kedua rantai DNA tersebut yang berlangsung pada suhu 60°C, dan *ekstensi* yaitu sintesis DNA melalui perpanjangan suatu primer mengikuti urutan nukleotida DNA rantai tunggal pasangannya yang umumnya berlangsung pada suhu 72°C.



Gambar 1. Kondisi PCR

Pada penelitian ini digunakan 2 pasang primer, kondisi selengkapnya dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel 1.

Tabel 1. Kondisi PCR untuk masing-masing analisis

Tahap denaturasi awal	95°C (4 menit)
Siklus PCR	30
Tahap denaturasi	95°C (30 detik)
Tahap annealing	54°C (30 detik)
Tahap ekstensi	72°C (30 detik)
Tahap ekstensi tambahan	72°C (7 menit)

Deteksi Produk PCR Dengan Elektroforesis Gel Agarose

Kualitas DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR dilihat dengan menggunakan teknik elektroforesis gel agarose (konsentrasi 2%). Elektroforesis dilakukan di dalam aparatus elektroforesis (*Horizontal MiniSubDNA Biorad*) yang berisi TBE 1x (Tris-Boric acid-EDTA, 1,8g/L, Tris pH 8,0 yang mengandung 5,5 g/l Boric Acid dan 0,5 M EDTA pH 8.0) dan ditambahkan zat interkalator Ethidium Bromide 0,1%. DNA hasil PCR sebanyak 5µl dicampur dengan 3 µl *loading dye* (0,25% bromophenol blue, 40% b/v sukrosa), kemudian dimasukkan dalam sumuran yang terdapat pada gel. Sebagai penanda ukuran pita-pita DNA hasil elektroforesis pada gel digunakan DNA marker (100bp DNA Ladder Cat no: 15628-019 Lot no. 1289697 sebanyak 3µg/ul: *Promega*) yang dicampur 2µl *loading dye* dan 4.5 ul 1x TBE buffer. Gel dielektroforesis pada tegangan listrik 110 volt. Selanjutnya dideteksi dengan menggunakan Gel Doc 1000 (*BioRad*, USA) untuk divisualisasi dengan sinar ultra violet pada panjang gelombang 300 nm dan direkam.

Deteksi Polimorfisme Gen COX-2 dengan Teknik RFLP

Deteksi polimorfisme gen COX-2 765G/C dilakukan dengan memotong DNA produk PCR dengan enzim restriksi endonuklease *Hha1*. Adanya polimorfisme pada promoter ini akan menyebabkan terbentuknya situs restriksi baru yang dapat dikenali oleh *Hha1*.

Produk PCR yang sudah ditambahkan dengan enzim restriksi dielektroforesis pada gel agarose 4% dengan tegangan listrik 110 volt. Hasil restriksi dianalisa dan dihubungkan dengan genotipe masing-masing dengan menggunakan sekuensing otomatis DNA selama 2 jam. Alel G pada posisi -765GG tampil dalam bentuk dua pita (*band*) dengan panjang 74 dan 26 pasangan basa. Sedangkan alel C pada posisi -765CC tampil dalam bentuk satu pita dengan panjang 100 pasangan basa pada gel agarose.pada posisi -765GC tampil dalam bentuk 3 pita (*band*) dengan panjang 100,74 dan 26 pasangan basa.

Pengolahan dan Penyajian Data

Data-data yang dikumpulkan diolah dengan SPSS versi 18.0 dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel frekuensi dan presentase yang disertai kalimat-kalimat narasi untuk memperjelas.

HASIL

Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam kurun waktu Mei-November 2012. Terdapat empat puluh (40) orang subjek penelitian yang merupakan penderita KKR, semuanya berasal dari seluruh etnis yang berdomisili di Sumatera Selatan dan bersedia ikut serta dalam penelitian, dengan frekuensi laki-laki pada kasus yaitu sebesar 21 orang (52,5%) dan wanita 19 orang (47,5%). Rerata umur pada kasus adalah $47,70 \pm 13,90$ tahun, dengan lokasi tumor 75% pada daerah rektum dan 25% pada daerah kolon.

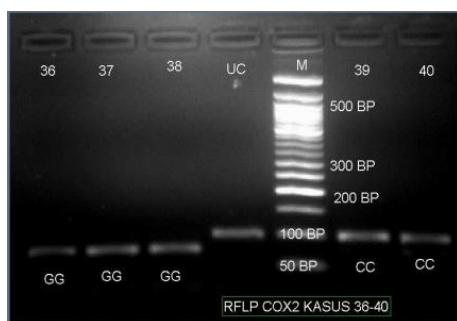
Hasil Pemeriksaan Patologi Anatomi

Hasil pemeriksaan PA dikelompokkan menurut kriteria jenis keganasan WHO, yaitu adenokarsinoma 31 sampel (77,5%), adenoskuamom karsinoma 2 sampel (5%), dan musinus adenokarsinoma 7 sampel (17,5%).

Polimorfisme Promoter-765G/C Gen COX-2

Polimorfisme adalah perbedaan individu pada level DNA, baik urutan basa DNA maupun panjang DNA yang terjadi karena adanya mutasi ataupun rekombinan yang tidak seimbang, sehingga memungkinkan terjadi perubahan fenotip ataupun menjadi suatu predisposisi kerentanan terhadap penyakit tertentu.⁷ Pada penelitian ini telah diidentifikasi adanya polimorfisme promoter-765G/C gen COX-2 dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP).

Gambaran amplikon hasil PCR gen COX-2 menggunakan 1 pasang primer oligonukleotida *forward* 5'TATTATGAGGAGATTTACCTTTCGC-3' dan *reverse* 5'GCTAAGTTGCTTTCAACAGAAGAAT-3', didapatkan hasil produk PCR pada posisi 100 bp, terlihat pada gambar 2.



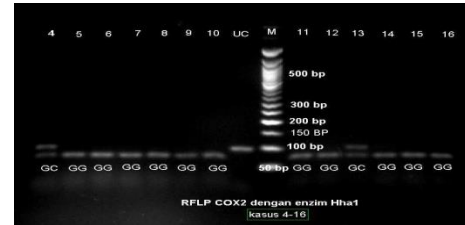
Gambar 2 Amplikon hasil produk PCR promoter -765 gen COX-2 pada posisi 100 bp pada lajur 39 dan 40. M= marker

Polimorfisme promoter-765 gen COX-2 dapat dilihat dengan adanya variasi gambaran alel hasil pemotongan (*digestion*) fragmen hasil isolasi DNA oleh enzim restriksi *HhaI*. Terdapat 3 variasi alel, yaitu:

1. Genotipe *homozygote mutant type* CC menunjukkan 1 pita pada 100 bp.
2. Genotipe *heterozygote carrier* GC menunjukkan 3 pita pada 100 bp, 74 bp, dan 26 bp.

3. Genotipe *homozygote wild* GG menunjukkan 2 pita pada 74 bp dan 26 bp.

Gambaran alel COX-2 didapat dari hasil PCR-RFLP yang dielektroforesis menggunakan medium gel agarosa, kemudian dilakukan visualisasi menggunakan penyinaran ultraviolet. Contoh gambaran alel G dan alel C dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 3. Hasil elektroforesis gen COX-2 setelah direstriksi menggunakan enzim *HhaI*. M= marker DNA penanda, UC= uncut (amplikon yang tidak dipotong dengan enzim *HhaI*). Alel C dan alel G pada lajur 4 dan 13 pada pita 100 bp, 74 bp dan 26 bp. Genotip GG pada lajur 5,6,7,8,9,10,11,12,14,15, dan 16. Genotip GC pada lajur 4 dan 13. Genotip CC= posisi UC.

Distribusi Genotip Promoter-765G/C Gen COX 2.

Dari hasil pemotongan dengan enzim tersebut, didapatkan visualisasi genotip promoter -765G/C gen COX-2 genotipe *mutant tipe* (CC dan GC) sebanyak 8 sampel (20%) dan genotip *wild tipe* normal (GG) sebanyak 32 sampel (80%).

Distribusi Alel Promoter-765G/C Gen COX-2

Distribusi alel pada kelompok kasus adalah 16% alel C dan 84% alel G. Tampak alel G (alel normal) lebih banyak dijumpai pada kelompok kasus.

Tabel 2: Distribusi frekuensi alel gen COX-2 pada kejadian Karsinoma Kolorektal

Alel	Jumlah Sampel ($\Sigma=40$)	Persen (%)
C	12	16
G	68	84
Total Sampel	40	100.0

Mutasi G · C pada promoter -765 Gen COX-2 ini berkaitan dengan sekitar 30% penurunan aktivitas promoter. Hal ini yang akan mengakibatkan seseorang lebih rentan terkena karsinoma kolorektal.⁷ Polimorfisme promoter 765G/C pada penderita karsinoma kolorektal didapatkan distribusi genotip yaitu GG (normal) 32 sampel (80%), GC/CC (mutan) 8 sampel (20%), sedangkan frekuensi alel G (normal) didapatkan 84% dan alel C (mutan) 16%.

Distribusi Genotip Promoter-765G/C Gen COX-2 Berdasarkan Lokasi Karsinoma

Pada tabel 3 menggambarkan distribusi genotip berdasarkan lokasi karsinoma, penderita kanker kolon dengan distribusi genotip GG, GC,

dan CC masing-masing 7(17,5%), 2(5%) dan 1(2,5%). Penderita kanker rektum distribusi genotip GG, GC, dan CC adalah masing-masing 25(62,5%), 2(5%) dan 3(7,5%).

Tabel 3: Distribusi genotip berdasarkan lokasi karsinoma kolorektal

Genotipe	Lokasi Kanker				Total	
	kolon		rektum		n	f (%)
	n	f (%)	n	f (%)		
GG	7	17,5	25	62,5	32	80,0
GC	2	5,0	2	5,0	4	10,0
CC	1	2,5	3	7,5	4	10,0
Jumlah	10	25	30	75	40	100,0

Distribusi Alel Promoter-765G/C Gen COX-2 Berdasarkan Lokasi Karsinoma

Tabel 10 menggambarkan distribusi alel berdasarkan lokasi kanker, penderita kanker kolon dengan alel G dan C adalah masing-masing 16(20%) dan 4(5%). Pada penderita kanker rektum dengan alel G dan C adalah masing-masing 52(65%) dan 8(10%).

Distribusi Genotif Promoter-765G/C Gen COX-2 Berdasarkan Jenis Kelamin.

Distribusi genotif terhadap jenis kelamin, yaitu genotif GG sebanyak 29 sampel (72,5%) terdiri atas 16 sampel (40,0%) pada laki-laki dan 13 sampel (32,5%) pada perempuan, genotif GC sebanyak 9 sampel (22,5%) terdiri atas 4 sampel (10,0%) pada laki-laki dan 5 sampel (12,5%) pada perempuan, genotif CC sebanyak 2 sampel (5,0%) terbagi pada laki-laki dan perempuan masing-masing 1 sampel (2,5%).

Distribusi Alel Promoter-765G/C Gen COX-2 Berdasarkan Jenis Kelamin.

Dari 40 sampel dengan genotif dari masing-masing sampel, maka dapat dilihat alel dari masing-masing sampel. Distribusi alel berdasarkan jenis kelamin, yaitu alel G sebanyak 67 alel (83,75%) terbagi atas 36 alel (45%) pada laki-laki, dan 31 alel (38,75%) pada perempuan, dan Alel C sebanyak 13 alel (16,25%) terbagi atas 6 alel (7,5%) pada laki-laki, dan 7 alel (8,75%) pada perempuan.

Distribusi Genotif Promoter-765G/C Gen COX-2 Berdasarkan Jenis Karsinoma.

Terhadap jenis karsinoma, didapatkan genotif GG sebanyak 29 sampel (72,5%) terdiri atas 23 sampel (57,5%) jenis adenokarsinoma, 1 sampel (2,5%) jenis adenoskuamus karsinoma, dan 5 sampel (12,5%) jenis musinus adenokarsinoma, genotif GC sebanyak 9 sampel (22,5%) terdiri atas 6 sampel (15%) jenis adenokarsinoma, 1 sampel (2,5%) jenis adenoskuamus karsinoma dan 2 sampel (5%) jenis musinus adenokarsinoma, genotif CC sebanyak 2 sampel (5,0%) yang keduanya merupakan jenis adenokarsinoma.

Distribusi Alel Promoter-765G/C Gen COX-2 Berdasarkan Jenis Karsinoma

Distribusi alel berdasarkan jenis karsinoma yang diderita, yaitu alel G sebanyak 67 alel (83,75%) terbagi atas 52 alel (65%) jenis

adenokarsinoma, 3 alel (3,75%) jenis adenoskuamus karsinoma, dan 12 alel (15%) jenis musinus adenokarsinoma, dan alel C sebanyak 13 alel (16,25%) terbagi atas 10 alel (12,5%) jenis adenokarsinoma, 1 alel (1,25%) jenis adenoskuamus karsinoma, dan 2 alel (2,5%) jenis musinus karsinoma.

Pembahasan

1. Karakteristik Subjek Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan frekuensi jenis kelamin penderita karsinoma kolorektal laki-laki lebih banyak dibandingkan wanita yaitu sebesar 52,5% dibanding 47,5%. Beberapa peneliti lain melaporkan hal yang sama. Penelitian Hoff JH dkk (2008)¹² didapatkan pada penderita karsinoma kolorektal laki-laki 59,8% dan wanita 40,2%, penelitian Saxena dkk(2008), kelompok laki-laki 62% dan wanita 38%, begitu juga dengan yang dilaporkan oleh Tan dkk(2007)¹⁶ 40,3% wanita dan 59,7% laki-laki.

Di Amerika insidensi KKR secara keseluruhan adalah 64 per 100.000 pria dan 46 per 100.000 wanita.⁽¹⁾Jenis kelamin laki-laki merupakan faktor resiko karsinoma kolorektal. Tingginya frekuensi pada laki-laki diduga karena gaya hidup yaitu merokok dan mengonsumsi alkohol yang tinggi.¹⁹ Namun dalam penelitian ini tidak didapatkan keterangan gaya hidup pada subjek.

Rerata umur pada kelompok kasus pada penelitian ini adalah 47,70 ± 13,90 tahun. Penelitian Ueda dkk (2008)¹⁸ melaporkan hasil rerata umur yaitu 52,4 ± 0,8 tahun¹⁸, sedangkan Hoff JH dkk (2008)¹² melaporkan rerata umur penderita KKR lebih rendah dibanding kelompok yang bukan penderita yaitu 62,7 ± 11,7 tahun dan 64,5 ± 10,7 tahun.

Usia merupakan faktor resiko terjadinya kanker kolorektal, di mana insidens KKR akan meningkat setelah usia 50 tahun. Lebih dari 90% KKR terdiagnosis pada usia lebih dari 50 tahun. Hal ini terjadi karena karsinoma diinduksi oleh karsinogen kimia, fisika maupun biologis memerlukan periodelaten yang lama. Periode laten karsinoma mencapai 20tahun atau lebih, sehingga gejala klinis seseorang dapat terjadi dalam usia tua.²¹ Tetapi, KKR dapat saja terjadi pada semua usia.⁽⁵⁾Pada penelitian ini penderita KKR di bawah 40 tahun sebanyak 30% sedangkan di atas 40 tahun sebanyak 70%.

Berdasarkan lokasi tumor pada penderita KKR penelitian ini yaitu pada daerah kolon 25% dan daerah rektum 75%. Pada penelitian Tan dkk (2007)¹⁶ didapatkan proporsi yang hampir sama antara lokasi tumor dikolon (40,3%) dan di rektum (59,7%). Namun hasil pada penelitian ini serupa dengan beberapa penelitian lain yang juga menunjukkan frekuensi karsinoma di rektum lebih tinggi dibanding karsinoma di kolon. Penelitian Samsuhidajat dkk (2006) mendapatkan karsinoma di kolon 18,2% dan di rektum 72,7%, sedangkan pada penelitian Gao dkk (2007)⁸ didapatkan proporsi yang hampir sama antara lokasi tumor dikolon 45,54% dan di rektum 54,5%.

Kolon dan rektum tidak memiliki vili, sehingga massa tinja akan kontak langsung dengan dinding kolon dan rektum yang hanya dilapisi oleh mukus. Faktor diet yang kurang serat menyebabkan berkurangnya massa tinja, peningkatan retensi tinja di usus, dan perubahan flora bakteri di usus. Sehingga produk sampingan berupa oksidatif karena penguraian karbohidrat oleh bakteri akan berpotensi toksik lebih tinggi pada usus. Toksik yang tinggi menjadikan kolon dan rektum berisiko mengalami karsinogenesis. Kemudian rektum yang terletak lebih rendah serta sering mengalami konstipasi membuat rektum lebih berisiko mengalami karsinogenesis.²²

Berdasarkan hasil pemeriksaan patologi anatomi jenis adenokarsinoma merupakan kasus yang terbanyak diikuti musinus adenokarsinoma dan adenoskuamua karsinoma. Pada penelitian ini didapatkan adenokarsinoma sebanyak 77,5%, musinus adenokarsinoma 17,5% dan adenoskuamua karsinoma 5%. Beberapa hasil penelitian Samsuhidajat (2006) menunjukkan jenis adenokarsinoma mencapai 95% dari jenis karsinoma yang banyak di temukan pada karsinoma kolorektal. Hal ini terjadi karena lapisan epitel yang mengalami karsinoma jarang bermetastasis hingga ke submukosa, karena banyak lapisan ekstraseluler mukus yang melindungi mukosa.

Polimorfisme Promoter-765G/C Gen COX-2

Pada penelitian ini didapatkan alel C (alel mutan) sebanyak 16% pada kelompok kasus. Pada penelitian Zhang dkk²⁷ didapatkan pada kasus KKR, ekspresi gen reporter promotor-765G COX-2 lebih tinggi dibandingkan dengan yang bukan penderita. Sedangkan penelitian di Amerika melaporkan adanya penurunan risiko adenoma kolorektal pada individu yang memiliki genotip 765GG, terutama ditemukan di kelompok kasus yang menggunakan obat antiinflamasi non-steroid (NSAID). Selain itu, risiko yang lebih rendah terjadinya adenoma kolorektal pada genotip -765CC hanya ditemukan pada kelompok non-pengguna NSAID. Pada penelitian Zhang dkk (2005)²⁷ dan Tan dkk (2008)¹⁶ melaporkan bahwa genotipe-765GC dikaitkan dengan peningkatan risiko karsinoma sel skuamosa esofagus dan KKR pada populasi Cina. Hal ini mungkin disebabkan adanya perbedaan ras dalam populasi penelitian sehingga hasil ini bertentangan.

Pada penelitian ini frekuensi genotip ditemukan pada kasus yang menderita KKR untuk polimorfisme promoter-765G/C adalah: GG 80%, GC 10%, CC 10%. Sedangkan pada penelitian Zhang dkk (2005)²⁷ pada populasi Cina dilaporkan frekuensi genotip GG sebesar 90,6%, 9,4% GC, 0% CC. Penelitian Tan dkk (2008)¹⁶ pada pasien Cina dengan KKR dilaporkan hampir sama dengan frekuensi genotip Zhang dkk (2005)²⁷: GG 91,6%, 8,4% GC, CC 0%. Temuan ini menunjukkan bahwa perbedaan etnis pada polimorfisme frekuensi genotip COX-2 mungkin memiliki efek modulasi berbeda pada fenotipe penyakit pada etnis yang berbeda. Tan dkk menemukan distribusi yang sama dari kedua genotipe COX-2 pada pasien dengan

kanker kolon (n = 403) maupun kanker rektum (n = 597)¹⁶

Tabel 4. Penelitian polimorfisme promoter-765 G/C gen COX-2 pada kejadian karsinoma kolorektal

Penelitian	Populasi	Persentase Genotip		
		GG	GC	CC
Hoff <i>et al</i> 2008	Belanda	73,9	23	3,1
Tan <i>et al</i> 2007	Cina	90,6	9,4	0
Ulrich <i>et al</i> 2008	Amerika	66,5	30	3,5
Cox <i>et al</i> 2004	Spain	62	33	5
Penelitian ini 2011	Sumsel	80	10	10

Pada penelitian di Amerika didapatkan bahwa adanya penurunan risiko terjadinya kanker kolorektal dan polip hiperplasia pada individu *heterozigot* dengan alel varian. Tetapi pada penelitian lain tidak ditemukan perbedaan distribusi genotip antara kelompok kontrol dan kelompok kasus, di Jepang 148 kasus dan 241 kontrol¹⁸, di Singapura etnis Cina 310 kasus dan 1177 kontrol²⁸, di Spanyol 292 kasus dan 274 kontrol¹³. Pada penelitian etnis Cina di Singapura didapatkan individu dengan genotip -765 GC atau -765 CC menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik, ada peningkatan dua kali lipat pada kasus kanker kolon, tetapi pada kasus kanker rektum tidak didapatkan perbedaan secara statistik.

Alel -765C umumnya ditemukan dalam jumlah yang sedikit pada etnis Kaukasia dan Afrika di Amerika. Frekuensi di berbagai negara antara 25-50%, sedangkan alel varian ini jarang ditemukan di Asia, frekuensi alel -765C pada bukan penderita dilaporkan pada penelitian lain, di Jepang (2,3%), Cina (2,2%) dan pada Etnis Cina di Singapura (4,8%).²⁷

Tabel 15 memaparkan beberapa penelitian tentang identifikasi polimorfisme promoter-765G/C Gen COX-2 pada kejadian kanker kolorektal berbagai populasi didapatkan hasil yang tidak jauh berbeda. Penelitian ini hanya menganalisa berdasarkan SNP sehingga kurang informatif, diperlukan penelitian lanjutan yang menganalisa *haplotype* yang saling berhubungan antar gen atau segmen DNA, sehingga hasil penelitian lebih akurat dengan melibatkan variasi beberapa polimorfisme genetik yang lebih luas.¹⁶

Temuan Baru Pada Penelitian Ini

Pada penelitian ini didapatkan beberapa temuan baru yaitu:

1. Frekuensi genotipe *mutant type* GC + CC yang lebih tinggi dibandingkan populasi di Asia.
2. Frekuensi genotip *mutant type* homozigot CC lebih tinggi dibandingkan populasi Asia.

Keterbatasan Penelitian

Sebuah penelitian harus mempertimbangkan semua variabel yang mungkin berpengaruh terhadap hasil penelitian sebagai faktor perancu (*confounding factor*). Banyaknya *eksposure* yang dapat mempengaruhi terjadinya KKR. Pada penelitian ini faktor yang harus dipertimbangkan sebagai faktor perancu yang mempengaruhi terjadinya KKR adalah faktor

lingkungan dan faktor diet sehari-hari.¹ Penelitian ini terbatas pada identifikasi polimorfisme gen COX2 pada kasus KKR, Penelitian ini tidak melihat hubungan atau pengaruh polimorfisme gen COX-2 terhadap kejadian KKR. Selain itu keterbatasan biaya dan waktu penelitian.

Kesimpulan

1. Penderita karsinoma kolorektal yang berjenis kelamin laki-laki (52,5%) lebih banyak daripada wanita (47,5%), lokasi karsinoma pada daerah kolon (25%) lebih banyak daripada daerah rektum (75%), dan penderita dengan adenokarsinoma (77,5%) merupakan jenis terbanyak diikuti musinus adenokarsinoma (17,5%) dan adenoskuamous karsinoma (5%)
2. Distribusi genotip CC (mutan) sebanyak 10%, genotip GC (heterozygot) sebanyak 10%, dan genotif GG (normal) sebanyak 80%. Sedangkan Distribusi alel C (mutan) sebanyak 16% dan alel G (normal) sebanyak 84%
3. Distribusi genotip KKR pada kolon dengan genotip GG, GC, dan CC sebanyak 17,5%, 5%, dan 2,5% dan pada rektum adalah 62,5%, 5% dan 7,5%, sedangkan distribusi alel G dan C pada kolon adalah 20% dan 5%, pada rektum adalah 65% dan 10%. Distribusi genotif GG pada laki-laki 40,0% dan pada perempuan 32,5%, genotif GC pada laki-laki 10,0% dan pada perempuan 12,5%, genotif CC pada laki-laki 5% dan pada perempuan 2,5%, sedangkan distribusi alel G pada laki-laki 45% dan pada perempuan 38,75%, alel C pada laki-laki 7,5% dan pada perempuan 8,75%
4. Distribusi genotif GG pada jenis adenokarsinoma 57,5%, adenoskuamus karsinoma 2,5%, dan musinus adenokarsinoma 12,5%, genotif GC jenis adenokarsinoma 15%, adenoskuamus karsinoma 2,5%, dan musinus adenokarsinoma 5%, genotif CC jenis adenokarsinoma sebanyak 5,0%, sedangkan distribusi alelnya adalah alel G pada jenis adenokarsinoma 65%, adenoskuamus karsinoma 3,75%, dan musinus adenokarsinoma 15%, alel C pada jenis adenokarsinoma 12,5%, adenoskuamus karsinoma 1,25%, dan jenis musinus karsinoma 2,5%.

Saran

1. Penelitian hendaknya dilakukan dengan jumlah sampel yang lebih besar, proporsi yang seimbang, dan jangka waktu yang lebih panjang agar dapat mewakili populasi.
2. Perlu dilakukan wawancara lebih lanjut terhadap pasien mengenai suku, etnis, riwayat keluarga.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hubungan polimorfisme promoter -765G/C Gen COX-2 dengan kejadian karsinoma kolorektal.

Ucapan terimakasih

Disampaikan pada DIPA Unsri yang telah membiayai penelitian ini dengan DIPA Nomor 0700.0/023-04.2.16/2012 tgl. 9 Desember 2011 Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan

Pekerjaan Penelitian Dosen Muda Sateks Universitas Sriwijaya Nomor: 168.b/UN9.3.1/PL/2012.

Daftar Pustaka

1. Bullard, K & Rothenberger, D. 2007. *Schwartz's principle's of Surgery*. 8 ed. Brunicaudi C F, editor. New York: The McGraw-Hill Companies: 234-45.
2. Indonesia KKAK. 2004. *Pengelolaan Karsinoma Kolorektal-Panduan Klinis Nasional*. Jakarta: 132-51.
3. Sjamsuhidajat, R & Karnadihardja, W. 2006. *Panduan Pengelolaan Karsinoma Kolorektal*. 2 ed. Jakarta: 112-19.
4. Juliet, H., Rene H.M., Hennie M.J. Roelofs. 2009. *COX-2 Polymorphisms 765G→C and -1195A→G and Colorectal Cancer Risk*. World J Gastroenterol. 8ed: 4561-65
5. Newmark H.L & Wargovich M.J. 1994. *Colon Cancer and Dietary Fat, Phosphate, and Calcium: a hypothesis*. J Natl Cancer Inst: 145-62.
6. Holt, R., Wolper, C., Moss, S., Yang, K., Lipkin, M. 1999. *Comparison of calcium supplementation or low-fat dairy foods on epithelial cell proliferation and differentiation*. Gastroenterol: 456-63
7. Pei-Yu, L., Kelvin, H.L. 2010. *From SNPs to Functional Polymorphism-The Insight Into Biotechnology Application*. Elsevier. Biochemical Engineering Journal 49: 149-158
8. Goodman, E., Bowman, E., Chanock, S., Alberg, A., Harris, C. 2004 *Arachidonate Lipoxygenase (ALOX) and Cyclooxygenase (COX) Polymorphisms and Colon Cancer Risk Carcinogenesis*. Cancer: 2467-72
9. Ueda, N., Maehara, Y., Tajima, O., Tabata, S., Wakabayashi, K. 2007. *Genetic Polymorphisms of Cyclooxygenase-2 and Colorectal Adenoma Risk: The Self Defense Forces Health Study*. Japanese Cancer Association: 576-81.
10. Fritsche, E., Baek, S.J., King, L.M., Zeldin, D.C., Eling, T.E. 2001. *Functional Characterization of Cyclooxygenase-2 Polymorphisms*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic. 299 (2): 468-76.
11. Dingzhi, W., Dubois, R.N. 2008. *Pro-Inflammatory Prostaglandins and Progression of Colorectal Cancer*. Cancer Letters. 267: 181-92.
12. Hoff, J.H., Morscher, Roelofs, H.M., Logt, E.M., Nagengast, F.M. 2009. *COX-2 Polymorphisms-765G→C and -1195A→G and Colorectal Cancer Risk*. World J Gastroenterol. 15 (36): 4561-5.
13. Cox, D., Pontes, C., Guino, E., Navarro, M., Osorio, A. 2004 *Polymorphisms in Prostaglandin Synthase-2/Cyclooxygenase-2 (PTGS2/COX2) and Risk of Colorectal cancer*. British Journal of Cancer. 91: 339-43.
14. Ulrich, C.M., Whitton, J., Yu, J.H., Sibert, J., Sparks, R. 2005. *PTGS2 (COX-2) -765GC Promoter Variant Reduces Risk of Colorectal Adenoma among Nonusers of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs*. Cancer Epidemiol Biomarkers prev. 14 (3): 616-9.
15. Tan, W., Wu, J., Zhang, X., Guo, Y., Liu, J. 2007. *Associations of functional polymorphisms in cyclooxygenase-2 and platelet 12-lipoxygenase with risk of occurrence and advanced disease status of colorectal cancer carcinogenesis*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic; 1197-201.
16. Li, G., Yang, T., Yan, J. 2002. *Cyclooxygenase-2 Increased The Angiogenic and Metastatic Potential of Tumor Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 299: 886-90.
17. Ueda, N., Maehara, Y., Tajima, O., Tabata, S., Wakabayashi, K., et al. 2008. *Genetic*

- Polymorphisms of Cyclooxygenase-2 and Colorectal Anenoma Risk. The self defense forces helthy study. Cancer Sci. 99: 576-81.*
18. Wang, D., Dubois, R.N. 2006. *Prostaglandins and Cancer*. Biochemical and Biophysical Research Communications 55 (1): 115-22.
 19. Dubois, R.N., Abramson, S.B., Gupta, R.A., Simon, L.S., Putte, L., et al. 1998 *Cyclooxygenase in Biology and Disease*. The FASEB Journal. 12: 1063-73.
 20. Wang, D., Dubois, R.N. 2008. *Pro-Inflammatory Prostaglandins and Progression of Colorectal Cancer*. Cancer Lett. 267 (2): 197-203.
 21. Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M.G., Allavena, P., et al. 2009. *Cellular and Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer*. Immunobiology. 214 (9-10): 761-77
 22. Warner, T.D., Vojnovic, I., Giuliano, F., Jimenez, R., Bishop-Bailey, D., et al. 2004. *Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and The Production of Prostaglandin I₂: Investigating The Activities of Acetaminophen and Cyclooxygenase-2-Selective Inhibitors in Rat Tissues*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic. 310 (2): 642-7.
 23. M´eric, J-B, Rottey, S., Olausson, K., Soria, J-C, Khayat, D. 2006. *Cyclooxygenase-2 as A Target For Anticancer Drug Development*. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 59: 51-64.
 24. Fritsche, E., Baek, S.J., King, L.M., Zeldin, D.C., Eling, T.E. 2001. *Functional Characterization of Cyclooxygenase-2 Polymorphisms*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic. 299: 468-76.
 25. Papafili, A., Hill, M., Brull, D., McAnulty, R., Marshall, R. 2002 *Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response*. ArteriosclerThrombVascBio.22: 1631-6.
 26. Zhang, X., Miao, X., Tan, W. 2005 *Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association With Risk of Esophageal Cancer*. Gastroenterology.129: 565-76.
 27. Campbell, N., Reece, J., Mitchell, L.2002. *Biology*. Jakarta: Penerbit Erlangga. Edisi kelima: 395-99.
 28. Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga. Hal. 145-64