

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI BRAF V600E DENGAN METASTASIS DAN DERAJAT DIFERENSIASI PADA ADENOKARSINOMA KOLOREKTAL

Ni Kadek Ayu Maya Damayanti^{1*}, Ni Wayan Winarti¹, Ni Putu Sriwidyani¹, Luh Putu Iin Indrayani Maker¹, Herman Saputra¹, I Made Muliarta²

¹Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, RSUP Sanglah Denpasar, Bali

²Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Email: maydyanti3690@gmail.com

ABSTRAK

Karsinoma kolorektal merupakan suatu tumor ganas epitelial usus besar yang terjadi akibat pengaruh dari faktor ekstrinsik dan intrinsik. Mutasi BRAF V600E ditemukan pada sekitar 10-15% kasus karsinoma kolorektal. Mutasi ini berkaitan dengan perilaku biologik agresif, metastasis, serta kurangnya respon terhadap terapi dengan inhibitor EGFR. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis dan derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal. Penelitian menggunakan rancangan analitik potong lintang dengan 43 sampel penderita adenokarsinoma kolorektal yang telah dilakukan pemeriksaan histopatologi pada periode tahun 2018-2019. Pulasan imunohistokimia dikerjakan untuk menilai ekspresi BRAF V600E. Ekspresi BRAF V600E dinyatakan positif jika 75% atau lebih sel tumor menunjukkan pulasan sitoplasma dengan intensitas kuat. Uji *chi-square* digunakan untuk menilai hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis dan derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal. Dari 43 kasus, ditemukan 7 kasus (16,3%) dengan ekspresi BRAF V600E positif. Ekspresi ini hanya dijumpai pada kasus dengan metastasis (7 dari 25 kasus), tidak dijumpai pada kasus tanpa metastasis (0 dari 18 kasus). Didapatkan hubungan bermakna antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis ($p=0,014$). Ekspresi BRAF V600E positif hanya ditemukan pada kasus derajat diferensiasi rendah (7 dari 35 kasus), tidak ditemukan pada derajat tinggi (0 dari 8 kasus), dan hubungan tersebut tidak bermakna secara statistik ($p=0,167$). Simpulan penelitian yaitu terdapat hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis pada adenokarsinoma kolorektal. Tidak terdapat hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi pada adenokarsinoma kolorektal.

Kata kunci: Karsinoma Kolorektal, Ekspresi BRAF V600E, Metastasis, Derajat Diferensiasi

ABSTRACT

Colorectal carcinoma is a malignant epithelial tumor of large bowel that occurs due to the influence of extrinsic and intrinsic factors. BRAF V600E mutation was found in about 10-15% of colorectal carcinoma. This mutation was associated with aggressive biologic behaviour, metastasis and lesser responsiveness to EGFR inhibitors therapy. The purpose of this study are to determine the association between BRAF V600E expression with metastasis and degree of differentiation of colorectal adenocarcinoma. This study used a cross sectional study and involved 43 samples of adenocarcinoma colorectal patients who had histopathological examinations in the period 2018-2019. Immunohistochemical were performed to assess the expression of BRAF V600E. This expression was concluded positive if 75% or more tumor cells showed strong cytoplasmic staining. Chi-square test was used to analyze the association BRAF V600E expression between metastasis and degree of differentiation colorectal adenocarcinoma. Within 43 colorectal adenocarcinoma cases, it was found 7 cases (16.3%) had positive expression of BRAF V600E. This expression was found in metastasis cases (7/25), not found in cases without metastasis (0/18). There was an association between BRAF V600E expression and metastasis ($p=0.014$). The positive expressions of BRAF V600E were only found in low grade differentiation (7/35 cases), were not found in high grade differentiation (0/8 cases), and no association between BRAF V600E mutation and the degree of differentiation ($p=0.167$). As conclusion, there was an association between BRAF

V600E expression and metastasis of colorectal adenocarcinoma. There was no significant association between BRAF V600E expression and the degree of differentiation of colorectal adenocarcinoma.

Keywords: *Colorectal carcinoma, BRAF V600E expression, Metastasis, Degree of differentiation*

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal (KKR) mewakili sekelompok penyakit heterogen molekuler. Biomarker molekuler memegang peranan penting untuk memahami heterogenitas biologis KKR dan untuk mengklasifikasikan KKR menjadi subtipe yang dapat digunakan untuk memprediksi prognosis, respon pengobatan, dan risiko kekambuhan. Jalur molekuler utama ini berpotensi dalam pemilihan terapi yang akan diberikan sesuai dengan kebutuhan penderita KKR.¹ Kanker kolorektal menduduki peringkat keempat sebagai kanker paling sering terjadi di seluruh dunia dan merupakan penyebab kematian terkait kanker tersering kedua.² Kanker ini menduduki peringkat keempat sebagai penyebab kematian terkait kanker yang paling sering di seluruh dunia. Insiden kanker kolon di Indonesia sebesar 8,6% dengan angka mortalitas 3,84%.^{3,4} Angka ini membuat KKR menempati peringkat keempat sebagai kanker dengan insiden tertinggi di Indonesia.³⁻⁵ Mutasi BRAF dijumpai pada satu dari sepuluh pasien yang mengalami KKR. Pasien dengan mutasi BRAF masih memiliki prognosis yang buruk, dengan median survival kurang dari 12 bulan.⁶ Studi Ritterhouse dan Barletta⁷, pada tahun 2015 menunjukkan mutasi BRAF terjadi pada 10-15% pasien KKR. Mutasi BRAF pada metastasis KKR juga berhubungan dengan *overall survival* yang buruk.^{7,8} Pasien yang mengalami diferensiasi buruk memiliki insiden yang lebih tinggi untuk terjadinya mutasi BRAF V600E dibandingkan dengan KKR diferensiasi baik/ sedang (7,77% dengan 2,92%, $P= 0,04$).⁹ Studi yang dilakukan oleh Wang dkk¹⁰, pada tahun 2017 dengan jumlah 63 penderita KKR dengan mutasi BRAF menunjukkan tumor dengan mutasi BRAF V600E lebih sering berlokasi pada kolon kanan (42,9%), hampir setengah pasien mengalami metastasis peritoneum (41,3%), cenderung bermetastasis ke kelenjar getah bening yang jauh (79,4%).

Mutasi pada BRAF juga berguna dalam memprediksi efikasi terapi karsinoma kolorektal yang menggunakan inhibitor EGFR berupa Cetuximab atau panitumumab. Hal ini dikarenakan mutasi BRAF menyebabkan aktivasi konsekutif dari kaskade sinyal sehingga terjadi proliferasi sel yang terus-menerus dan pertumbuhan tumor yang tidak terkontrol. Efek tersebut terjadi secara *downstream* pada reseptor EGFR, sehingga membuat tumor ini resisten terhadap anti-EGFR.^{11,12}

Derajat diferensiasi pada KKR berdasarkan pembentukan kelenjar dan komponen diferensiasi. Derajat diferensiasi rendah untuk diferensiasi baik hingga sedang dan derajat diferensiasi tinggi.^{13,14} Tumor dengan derajat diferensiasi tinggi (diferensiasi buruk) berhubungan dengan

peningkatan nodal yang diinfiltrasi sel tumor dan metastasis jauh, serta prognosis yang lebih buruk.¹⁵

Penting bagi para klinisi untuk dapat mengetahui status molekuler pasien KKR. Skrining dan deteksi dini memungkinkan para praktisi kesehatan untuk memahami aspek genetik dan epigenetik dalam tumorigenesis KKR sehingga morbiditas dan mortalitas dapat ditekan.¹² Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk menilai hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis dan derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal di RSUP Sanglah.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan yang digunakan adalah studi potong lintang. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar. Waktu penelitian dilaksanakan selama 3 bulan, yaitu dari bulan April hingga Juni 2021.

Ruang lingkup penelitian berupa gambaran mikroskopis penderita adenokarsinoma kolorektal yang dilakukan pemeriksaan histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar, didiagnosis ulang untuk mendapatkan sampel sesuai kriteria inklusi dan eksklusi, kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia untuk menilai ekspresi BRAF V600E. Ekspresi BRAF V600E akan dihubungkan dengan kejadian metastasis dan derajat diferensiasi adenokarsinoma kolorektal.

Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah penderita adenokarsinoma kolorektal yang telah dilakukan pemeriksaan histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar periode 1 Januari 2018 sampai 31 Desember 2019 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Adapun kriteria inklusi penelitian ini, yaitu 1) blok parafin dari bahan operasi reseksi karsinoma kolorektal yang didiagnosis sebagai adenokarsinoma kolorektal melalui pemeriksaan histopatologi; 2) blok parafin dalam kondisi baik dan masih mengandung jaringan tumor yang cukup untuk dilakukan pemeriksaan imunohistokimia; 3) sampel memiliki data pemeriksaan radiologi *rontgen thorax* atau *CT-scan thorax* dan *ultrasonography* (USG) abdomen dan/atau hasil pemeriksaan sitologi (cairan paru atau abdomen). Kriteria eksklusinya, yaitu 1) kasus adenokarsinoma kolorektal yang telah mendapatkan terapi tambahan berupa kemoterapi

maupun radioterapi yang diperoleh melalui data formulir pemeriksaan histopatologi atau penelusuran rekam medis; dan 2) blok parafin rusak, berjamur, atau blok parafin tidak ditemukan.

Pemeriksaan protein BRAF V600E

Eksresi positif protein BRAF V600E pada pulasan imunohistokimia dievaluasi pada sampel menggunakan metode skoring yang telah digunakan pada penelitian sebelumnya.¹⁶ Pulasan yang dinilai positif hanyalah pulasan sitoplasma.^{16,17} Kriteria positif ditetapkan apabila sitoplasma terpulsa difus dengan intensitas kuat pada lebih dari 75% sel tumor. Penilaian ekspresi BRAF V600E dilakukan oleh peneliti dan dua orang ahli Patologi Anatomi menggunakan mikroskop cahaya binokuler *Olympus CX23*, dilakukan secara *blind independent* tanpa mengetahui data metastasis dan derajat diferensiasi pasien. Apabila terjadi perbedaan dalam penentuan ekspresi BRAF V600E di antara peneliti dan dua orang ahli Patologi Anatomi tersebut maka dilakukan kesepakatan bersama secara konsensus.

Analisis data

Data diolah dengan menggunakan Program *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20.0 for Windows*. Analisis deskriptif dilakukan pada data karakteristik sampel penelitian. Analisis *Chi square*

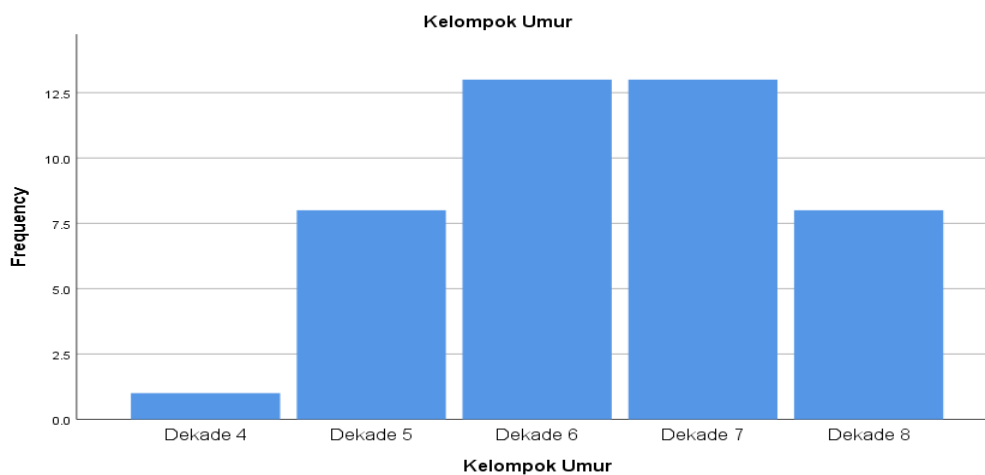
berdasarkan tabel silang 2x2 untuk menganalisis hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis pada adenokarsinoma kolorektal dan hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi pada adenokarsinoma kolorektal. Nilai batas kemaknaan (α) ditentukan pada probabilitas (p) <0,05.

HASIL

Total sampel sebanyak 43 sampel yang dipilih dengan cara *consecutive sampling* yakni dengan pemilihan sampel dengan menetapkan subjek yang memenuhi kriteria penelitian. Selama periode penelitian 1 Januari 2018 sampai 31 Desember 2019 dari data pemeriksaan histopatologi diperoleh sampel adenokarsinoma kolorektal yang memenuhi kriteria penelitian sebanyak 55 pasien dan dipilih secara *consecutive sampling* sebanyak 43 pasien.

Berdasarkan variabel usia didapatkan usia termuda 33 tahun dan usia tertua 80 tahun, usia rata-rata $60,28 \pm 10,944$ tahun. Setelah dikelompokkan berdasarkan dekade usia, maka didapatkan kasus terbanyak pada dekade ke enam dan ke tujuh (Gambar 1) yaitu masing-masing sebanyak 13 kasus (30,2%). Gambaran karakteristik sampel penelitian lainnya disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan parameter metastasis, distribusi lokasi metastasis yaitu pada paru-paru sebanyak 18 kasus (72%), hepar sebanyak 6 kasus (24%) serta ke hepar dan paru-paru sebanyak 1 kasus (4%).

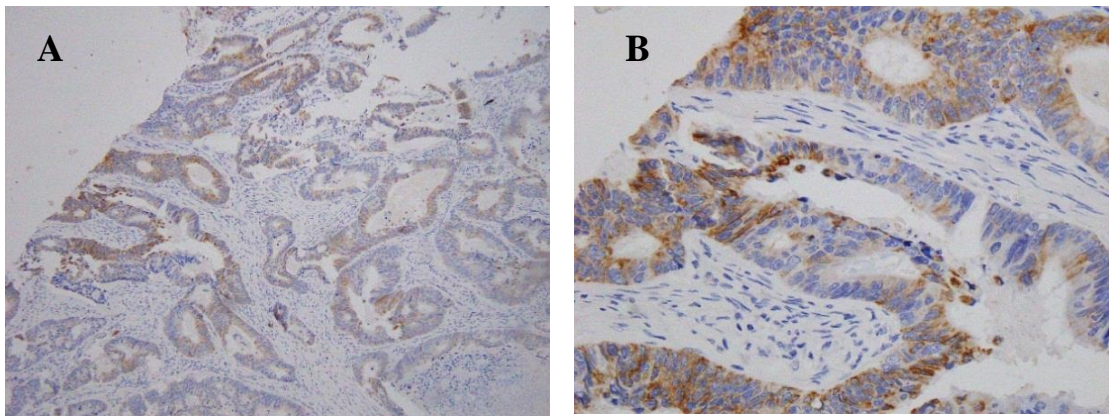
Pada penelitian ini menunjukkan ekspresi BRAF V600E positif sebanyak 7 (16,3%) kasus serta ekspresi BRAF V600E negatif sebanyak 36 (83,7%) kasus. Pulasan imunohistokimia BRAF V600E positif dan negatif disajikan pada Gambar 2 dan 3.



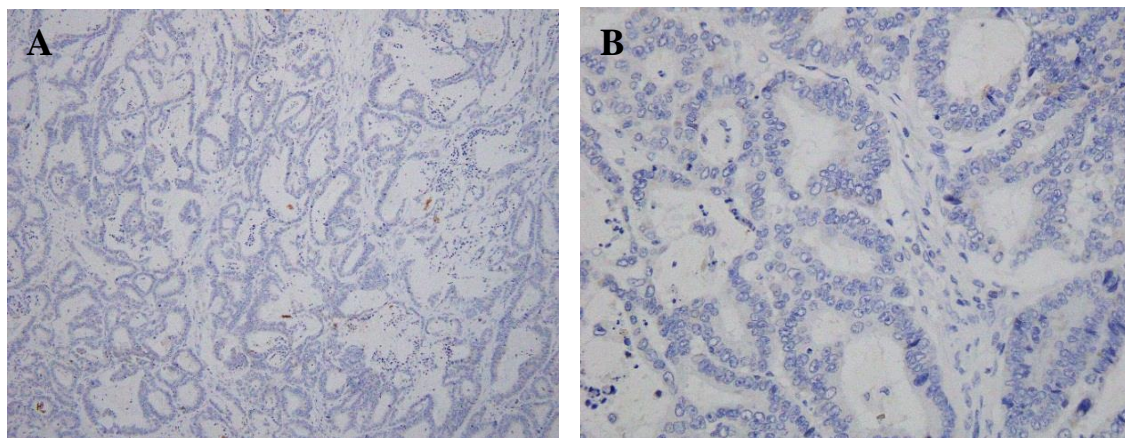
Gambar 1. Diagram batang distribusi KKR berdasarkan kelompok umur

Tabel 1. Gambaran karakteristik sampel penelitian

Karakteristik sampel		Frekuensi	Persentase (%)
Jenis kelamin	Laki-laki	30	69,8
	Perempuan	13	30,2
Metastasis	Positif	25	58,1
	Negatif	18	41,9
Derajat diferensiasi	Tinggi	8	18,6
	Rendah	35	81,4



Gambar 2. Pulasan imunohistokimia BRAF V600E positif. A. Pembesaran 100x. B. Pembesaran 400x.



Gambar 3. Pulasan imunohistokimia BRAF V600E negatif. A. Pembesaran 100x. B. Pembesaran 400x.

Tabel 2. Hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi

Parameter		Derajat diferensiasi		Total (%)	p
		Tinggi (%)	Rendah(%)		
Ekspresi BRAF	Positif	0 (0)	7 (100)	7 (100)	0,167*
	Negatif	8 (22,2)	28 (77,8)	36 (100)	

* Nilai batas kemaknaan pada $p < 0,05$

Tabel 3. Hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis

Parameter		Metastasis		Total (%)	P
		Positif (%)	Negatif (%)		
Ekspresi BRAF	Positif	7 (100)	0 (0)	7 (100)	0,014*
	Negatif	18 (50%)	18 (50%)	36 (100)	

* Nilai batas kemaknaan pada $p < 0,05$

Tabel 4. Hubungan antara derajat diferensiasi dengan metastasis

Parameter		Metastasis		Total (%)	p
		Positif (%)	Negatif (%)		
Derajat diferensiasi	Tinggi	2 (25)	6 (75)	8 (100)	0,035
	Rendah	23 (65,7)	12 (34,3)	35(100)	

* Nilai batas kemaknaan pada $p < 0,05$

Ekspresi BRAF V600E positif tidak ditemukan pada kasus derajat diferensiasi tinggi dan 7 (100%) kasus derajat diferensiasi rendah. Sementara ekspresi BRAF V600E negatif ditemukan pada 8 (22,2%) kasus derajat diferensiasi tinggi dan 28 (77,8) kasus derajat diferensiasi rendah (Tabel 2).

Hasil analisis *chi-square* pada tabel 2 didapatkan nilai $p=0,167$ yang menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara ekspresi BRAF dengan derajat diferensiasi pada adenokarsinoma kolorektal.

Semua kasus ekspresi BRAF V600E positif (100%) menunjukkan metastasis positif. Sementara kasus dengan ekspresi BRAF negatif, 18 kasus (50%) dengan metastasis positif dan 18 kasus (50%) dengan metastasis negatif (Tabel 3). Terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis pada adenokarsinoma kolorektal ($p=0,014$).

Pada kasus dengan derajat diferensiasi tinggi, 25% menjadi metastasis positif sementara kasus dengan derajat diferensiasi rendah hanya 8 kasus (22,2%) yang menjadi metastasis positif (Tabel 4). Terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara derajat diferensiasi dengan metastasis pada adenokarsinoma kolorektal ($p=0,035$).

DISKUSI

Karsinoma kolorektal didefinisikan sebagai suatu tumor ganas epitelial yang berasal dari usus besar, di mana sel tumor telah menembus lapisan muskularis mukosa dan mencapai lapisan submukosa.¹⁸ Umur merupakan salah satu faktor risiko dari KKR. Di Amerika serikat, umur lebih dari 65 tahun memiliki kemungkinan 3 kali lebih besar untuk menderita KKR dibandingkan dengan umur 50-64 tahun, 30 kali lebih besar daripada umur 25-49 tahun.^{19,20} Di Asia, risiko KKR meningkat secara dramatis setelah usia 50

tahun. Sebanyak 90% dari seluruh penderita KKR terdiagnosis pada usia lebih dari 50 tahun.²¹ Pada penelitian ini juga menemukan bahwa usia rata-rata 60,28 tahun serta insiden terbanyak terjadi pada dekade ke enam dan ke tujuh yaitu sebanyak 60,4%.

Pada semua daerah dan umur, laki-laki memiliki kemungkinan 1,5 kali lebih besar terkena KKR dibandingkan wanita.^{19,20,22} Etiologi dari faktor tersebut belum diketahui secara pasti. Beberapa teori yang dikemukakan antara lain, perbedaan hormonal antara pria dan wanita dimana hormon estrogen dan progesterin dapat mencegah terjadinya KKR.^{20,22} Sejalan dengan penelitian ini yang menemukan insiden KKR lebih banyak terjadi pada laki-laki daripada perempuan (2,3:1).

Sebanyak 4,4% kasus KKR menunjukkan adanya mutasi BRAF, terutama mutasi V600E pada ekson 15.²³ Studi yang dilakukan oleh Ritterhouse dan Barletta⁷, pada tahun 2015 menunjukkan mutasi BRAF V600E terjadi pada kurang lebih 10-15% pasien KKR. Mutasi BRAF dapat dijumpai pada 7-10% pasien KKR metastasis, 60% MSI *high tumors* dan hanya 5-10% tumor *microsatellite stable* (MSS).^{6,12}

Menurut studi yang dilakukan oleh Kwon dkk¹⁷, pada tahun 2018, IHK BRAF V600E dapat dipergunakan untuk mendeteksi mutasi BRAF V600E. Hernowo dkk²⁴, pada tahun 2014 yang melakukan studi di Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung menyimpulkan bahwa hasil pewarnaan imunohistokimia BRAF V600E dapat dipakai sebagai penanda KKR yang lebih agresif. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian ini yang mendapatkan hasil ekspresi positif BRAF V600E pada 16,3% kasus.

Studi metaanalisis oleh Wang dkk²⁵, tahun 2019 yang menggunakan 20 penelitian untuk menilai hubungan antara mutasi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi tumor didapatkan hasil pada 7,81% kasus dengan derajat diferensiasi baik hingga sedang menunjukkan adanya mutasi BRAF serta 26,34% kasus dengan derajat diferensiasi buruk menunjukkan adanya mutasi BRAF. Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Vilkin dkk²⁶, tahun 2009 dan Rako dkk²⁷, tahun 2012 mendapatkan hasil bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan hasil dari penelitian ini dimana hasil ekspresi BRAF V600E positif tidak ditemukan pada kasus dengan derajat diferensiasi tinggi dan 7 (100%) kasus derajat diferensiasi rendah. Sementara ekspresi BRAF negatif ditemukan pada 8 (22,2%) kasus derajat diferensiasi tinggi dan 28 (77,8%) kasus derajat diferensiasi rendah.

Tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi pada adenokarsinoma kolorektal dapat disebabkan oleh perbedaan jumlah sampel dan perbandingan jumlah kasus antara derajat diferensiasi rendah dengan derajat diferensiasi tinggi yang tidak berimbang. Penelitian yang dilakukan oleh Chen dkk²⁸ dan Wang dkk²⁵ merupakan penelitian metaanalisis dengan jumlah sampel yang besar yaitu >1000

kasus dan perbandingan jumlah kasus antara derajat diferensiasi rendah dengan derajat diferensiasi tinggi yang hampir setara.

Penelitian ini mendapatkan hasil terdapat hubungan yang signifikan secara statistik antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis pada KKR. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kwon dkk¹⁷, 2018. Penelitian tersebut mendapatkan hasil metastasis jauh baik unifokal maupun multifokal berhubungan dengan mutasi BRAF V600E ($p < 0,001$). Studi lainnya yang dilakukan oleh Saridaki dkk²⁹, tahun 2013 yang menganalisis hubungan antara jumlah lokasi metastasis dengan mutasi pada BRAF V600E pada kasus metastasis KKR, didapatkan hasil bahwa mutasi pada BRAF berhubungan dengan metastasis lebih dari 1 lokasi ($p = 0,002$). Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya mutasi pada BRAF V600E, yang salah satunya ditandai dengan ekspresi positif pada pemeriksaan IHK merupakan faktor krusial pada terjadinya dan perkembangan dari KKR. Namun, masih terdapat 18 kasus dengan status ekspresi BRAF V600E negatif. Hal ini dapat disebabkan oleh mutasi BRAF yang terjadi tidak hanya pada V600E saja. Mutasi BRAF yang lain memegang peranan dalam menentukan status metastasis walaupun dalam persentase yang lebih kecil dibandingkan V600E. Selain mutasi BRAF, prognosis buruk penyakit KKR juga dapat ditentukan dari status molekuler mutasi MSI dan CIMP.³⁰ Hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut yang meneliti kondisi mutasi lainnya yang dapat menyebabkan metastasis positif antara lain status mutasi KRAS serta MMR DNA (MSI/MSS dan CIMP).

Ketika dilakukan analisis hubungan antara derajat diferensiasi dengan metastasis ditemukan adanya hubungan yang signifikan secara statistik antara derajat diferensiasi dengan metastasis pada adenokarsinoma kolorektal ($p = 0,035$). Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Minhajat dkk³¹ pada tahun 2020. Terdapat hubungan signifikan antara diferensiasi adenokarsinoma kolorektal dengan metastasis ($p < 0,0001$). Metastasis jauh ditemukan pada sebagian besar (62%) adenokarsinoma diferensiasi buruk, sementara pada sebagian besar kasus (73,2%) adenokarsinoma diferensiasi baik tidak terdapat metastasis. Hubungan antara derajat diferensiasi dengan metastasis pada KKR dapat disebabkan oleh adanya peningkatan aktivitas mitosis dan hiperproliferasi sel ganas pada KKR dengan diferensiasi buruk.³¹

SIMPULAN

Tidak terdapat hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan derajat diferensiasi pada adenokarsinoma kolorektal di RSUP Sanglah Denpasar. Terdapat hubungan antara ekspresi BRAF V600E dengan metastasis pada adenokarsinoma kolorektal di RSUP Sanglah Denpasar. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi peran molekul lain, seperti MSI/MSS, KRAS serta CIMP untuk mendapatkan informasi lebih lengkap dalam memprediksi hasil klinis KKR.

DAFTAR PUSTAKA

- Fredericks, E., Dealtry, G., and Roux, S. Molecular aspects of Colorectal Carcinogenesis: A Review. *J Cancer Biol Re*, 2015;3(1):1057.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 69-90.
- Caputo, F., Santini, C., Bardasi, C., Cerma, K., Casadei-Gardini, A., Spallanzani, A., Andrikou, K., Cascinu, S., Gelsomino, F. BRAF-mutated colorectal cancer: clinical and molecular insights. *Int J Mol Sci*, 2019;20: 1-18.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fedewa, S.A., Ahnen, D.J., Meester, R.G.S., Barzi, A., Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 2017;67:177-93.
- Rompis, A.Y. dan Dewi, N.N.A. Aspek Genetik Kanker Kolorektal. *J Sains Kes*, 2020;2(3):236-245.
- Luu, L.J. dan Price, T.J. BRAF mutation and its importance in colorectal cancer. *IntechOpen*, 2019:1-18.
- Ritterhouse, L.L. dan Barletta, J.A. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 2015:1-9.
- Loupakis, F., Intini, R., Cremolini, C., Orlandi, A., Bianchi, A.S., Pietrantonio, F., Pella, N., Spallanzani, A., Aquila, E.D., Scartozzi, M., Luca, E.D., Rimassa, L., Formica, V., Leone, F., Calvetti, L., Aprile, G., Antonuzzo, L., Urbano, F., Prenen, H., Negri, F., Donato, S.D., Buonandi, P., Tomasello, G., Avallone, A., Zustovich, F., Moretto, R., Antoniotti, C., Salvatore, L., Calegari, M.A., Siena, S., Morano, F., Ongaro, E., Cascinu, S., Santini, D., Ziranu, P., Schirripa, M., Buggin, F., Prete, A.A., Depetris, I., Biason, P., Lonardi, S., Zagonel, V., Fassan, M., Maio, M.D. A validated prognostic classifier for V600E BRAF-mutated metastatic colorectal cancer: the 'BRAF BeCool' study. *European Journal of Cancer*, 2019;118:121-130.
- Zhang, X., Wu, J., Wang, L., Zhao, H., Li, H., Duan, Y., Li, Y., Xu, P., Ran, W., Xing, X. HER2 and BRAF mutation in colorectal cancer patients: a retrospective study in Eastern China. *PeerJ*, 2020;8(8602):1-18.
- Wang, X., Wei, Q., Gao, J., Li, J., Li J., Gong, J., Li, Y., Shen, L. Clinicopathologic features and treatment efficacy of Chinese patients with BRAF-mutated metastatic colorectal cancer: a retrospective observational study. *Chin J Cancer*, 2017;36(81):1-9.
- Manne, U., Shanmugam, C., Katkoori, V.R., Bumpers, H.L., Grizzle, W.E. Development and progression of colorectal neoplasia. *Cancer Biomarkers*. NIH Public Access, 2011;9(1-6):235-265.
- Clarke, C.N. dan Kopetz, E.S. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol*, 2015;6(6):660-667.
- Hamilton, S.R., Bosman, F.T., Boffeta, P., Ilyas, M., dan Morreau, H. Carcinoma of the colon and rectum. In: Halmiton, S.R., Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, H.R., Theise, N.D. *World Health Organization Classification of Tumours, 4th edition*. France: International Agency for Research on Cancer, 2010:134-5.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S.F., Wang, H.L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 2012;3(3):153-173.
- Marzouk, O., dan Scholfield. Review of Histopathological and Molecular Prognostic Features in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 2011;3(2):2767-2810.
- Toon, C.W., Walsh, M.D., Chou, A., Capper, D., Clarkson, A., Sioson, L., Clarke, S., Mead, S., Walters, R.J., Clendenning, M., Young, J.P., Win, A.K., Hopper, J.L., Crook, A., Deimling, A., Jenkins, M.A., Buchanan, D.D., Gill, A.J. BRAFV600E Immunohistochemistry Facilitates Universal Screening of Colorectal Cancers for Lynch Syndrome. *Am J Surg Pathol*, 2013;37(10):1592-1602.
- Kwon, J.H., Jeong, B.K., Yoon, Y.S., Yu, C.S., Kim, J. Utility of BRAF VE1 immunohistochemistry as a screening tool for colorectal cancer harboring BRAF V600E mutation. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 2018;52(3):157-163.
- Nagtegaal I.D., Arends M.J., Odze R.D. Tumours of the colon and rectum: introduction. In: Lokuhetty D., White V.A., Watanabe R., Cree I.A., editors. *World Health Organization Classification of Tumours, 5th Ed*. France: International Agency for Research on Cancer, 2019:157-186.
- Rawla, P., Sunkara, T., and Barsouk, A. Epidemiology of Colorectal Cancer: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 2019;14(2):89-103.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Sauer, A.G., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A., Jemal, A. Colorectal Cancer Statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020;70(3):145-164.
- Wong, M., Ding, H., Wang, J., SF Chan, P., & Huang, J. Prevalence and risk factors of colorectal cancer in Asia. *Intestinal Research*, 2019;17(3):317-329.
- Putranto, A.S., and Julistian, J. Risk Factors of Colorectal Carcinoma Incidence in Young Adults: A Meta-analysis. *The New Ropanasuri Journal of Surgery*, 2019;4(1):1-6.
- Dewi, N.N.A., Sumadi, I W.J., Sun, H.S. Molecular Profile of Colorectal Cancer Patients in Bali Based On Methylation Of O⁶-Methylguanine DNA Methyltransferase Promoter Region and Mutation of BRAF and Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog Gene. *J Med Sci*, 2020;20(10):1-8.
- Hernowo, B., Ariyanni, F., Suryanti, S., Hasan, A.H. Use of BRAF V600E as a molecular marker in aggressive colorectal cancer. *Acta Med Indones*, 2014;46(2):104-110.

25. Wang dkk. (2019)= Wang, J., Shen, J., Huang, C., Cao, M., Shen, L. Clinicopathological Significance of BRAF V600E Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *Journal of Cancer*, 2019;10(10):2332-2341.
26. Vilkin, A., Niv, Y., Nagasaka, T., Morgenstern, S., Levi, Z., Fireman, Z., Fuerst, F., Goel, A., Boland, C.R. Microsatellite instability, MLH1 promoter methylation, and BRAF mutation analysis in sporadic colorectal cancers of different ethnic groups in israel. *Cancer*, 2009;115(4):760–769.
27. Rako, I., Jakic-Razumovic, J., Katalinic, D., Sertic, J., and Plestina, S. Mutation pattern of KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer patients. *Neoplasma*, 2012;59(4):376–383.
28. Chen, D., Huang, J.F., Liu, K., Zhang, L.Q., Yang, Z., Chuai, Z.R., Wang, Y.Z., Shi, D.C., Huang, Q., and Fu, W.L. BRAFV600E Mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 2014;9(3):1–9.
29. Saridaki, Z., Tzardi, M., Sfakianaki, M., Papadaki, C., Voutsina, A., Kalykaki, A., Messaritakis, I., Mpananis, K., Mavroudis, D., Stathopoulos, E., Georgoulas, V., Souglakos, J. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: Correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. *PLoS ONE*, 2013;8(12):2–8.
30. Inamura, K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers*, 2018;10(26):1-18.
31. Minhajat, R., Benyamin, A.F., Miskad, U.A. The Relationship Between Histopathological Grading and Metastasis in Colorectal Carcinoma Patients, 2020;5(2):51–60.