

# HUBUNGAN EKSPRESI *HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF) 1- $\alpha$* TERHADAP KEMATIAN SEL PADA KANKER KOLOREKTAL

Indrayanti<sup>1</sup> Nungky Kescandra<sup>2</sup>

1. Bagian Patologi Anatomi, 2. Mahasiswa Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta  
Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan, Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

## INTISARI

Kanker kolorektal merupakan salah satu kanker terbanyak ketiga di dunia dan di Negara Indonesia. Pertumbuhan sel tumor dipengaruhi oleh adaptasi metabolik, resistensi apoptosis, angiogenesis, dan metastasis. Mutasi gen p53 akan menyebabkan proliferasi sel tumor yang progresif dan kurangnya vaskularisasi yang tidak adekuat akan menyebabkan suatu keadaan hipoksia dan menginduksi faktor transkripsi HIF-1 $\alpha$ . Dalam keadaan hipoksia, HIF akan masuk dan terakumulasi dalam nukleus, dimana HIF-1 $\alpha$  ini merupakan transduksi sinyal ekspresi gen beberapa protein, di antaranya adalah beberapa protein penting bagi sel kanker dalam menginduksi angiogenesis sel endotel. Pertumbuhan sel tumor yang progresif dan kurangnya angiogenesis akan menyebabkan kematian sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara ekspresi HIF-1 $\alpha$  dengan gambaran histopatologi kematian sel kanker kolorektal.

Metode penelitian ini bersifat analitik kategorik tidak berpasangan dengan pendekatan *cross sectional*. Ekspresi HIF-1 $\alpha$  diperoleh dengan metode pengecatan imunohistokimia terhadap specimen kanker kolorektal. Sel tumor yang tercat positif dan nekrosis dinilai.

Hasil uji Chi-Square menghasilkan nilai signifikansi  $p=0.027$  ( $p<0.05$ ) maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi HIF-1 $\alpha$  dengan gambaran histopatologi kematian sel kanker kolorektal.

Kata kunci: Kanker kolorektal, *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$* , apoptosis, nekrosis, kematian sel

## ABSTRACT

Colorectal cancer is the third most common cancer in world wide also in Indonesia. Tumor cell growth depends on metabolic adaptation, apoptosis resistance, angiogenesis, and metastasis. P53 gene mutation causes progressive tumor cell proliferation and lack of inadequate vascularization would lead to a hypoxia condition and induces the transcription factor HIF - 1 $\alpha$ , in a state of hypoxia, HIF will enter and accumulate in the nucleus, where HIF - 1 $\alpha$  expression is a signal transduction some protein genes, among which are several proteins important for cancer cells to induce angiogenesis in endothelial cell . Progressive growth of tumor cells and lack of angiogenesis will lead to cell death. This study aims to determine the relationship between HIF - 1 $\alpha$  expression with histopathological picture of cell death in colorectal cancer.

This research method is categorical analytic not paired with a cross sectional approach . Expression of HIF - 1 $\alpha$  was obtained by the method of immunohistochemical staining against colorectal cancer specimens. stained positive tumor cells and necrosis assessed . The results of Chi-Square test in significant value  $p = 0.027$  ( $p < 0.05$ ), it can be concluded that there is a significant relationship between the expression of HIF - 1 $\alpha$  with histopathologic picture of cell death in colorectal cancer .

Keywords : Colorectal cancer , *Hypoxia Inducible Factor - 1 $\alpha$*  , apoptosis , necrosis , death cell.

## PENDAHULUAN

Kanker korektal merupakan penyebab terbanyak ketiga kematian di seluruh dunia, dan fakta menunjukkan bahwa jumlah kasus terus meningkat dari tahun-ketahun. Data dari Globocan tahun 2008, insidensi kanker kolorektal di Indonesia pada tahun 2008 sebanyak 33.379 jiwa dan menduduki jumlah terbanyak ketiga dari jumlah insidensi penyakit kanker. Angka mortalitasnya sebesar 25.253 jiwa<sup>3</sup>.

Pertumbuhan sel tumor dipengaruhi oleh adaptasi metabolik, resistensi apoptosis, angiogenesis, dan metastasis. Pertumbuhan sel kanker yang sangat cepat akan menginduksi keadaan kekurangan oksigen (hipoksia) pada sel kanker tersebut, oleh karena itu sel kanker akan merespon dengan mengekspresikan *hypoxia inducible factor* (HIF). Dalam keadaan

hipoksia, HIF akan masuk dan terakumulasi dalam nukleus (inti sel), dimana HIF ini merupakan transduksi sinyal ekspresi gen beberapa protein, di antaranya adalah beberapa protein penting bagi sel kanker dalam menginduksi peristiwa angiogenesis sel endotel<sup>5</sup>.

Pada kanker dengan proliferasi yang sangat meningkat dengan vaskularisasi yang tidak mencukupi maka kebutuhan oksigen dan glukosa terbatas. sel dipaksa memproduksi ATP melalui jalur glikolisis anaerob. Kemudian akan terjadi asidosis yang dapat menyebabkan influx  $\text{Ca}^{2+}$  oleh *activating acid-sensing ion channel* (ASICs).  $\text{Ca}^{2+}$  yang terus menerus dapat menstimuli mitokondrial dehidrogenase, yaitu dapat merusak kemampuan sel untuk menekan transport elektron melalui rantai transport elektron selama hipoksia. Kenaikan influks elektron oleh

mitokondria dan kenaikan aktivitas enzim dari xanthin oksidase dan NADPH akan memacu pengeluaran ROS (reactive oxygen stimulate) atau yang biasa disebut radikal bebas. Hipoksia, pengurangan glukosa, asidosis, dan ROS akan menyebabkan kematian sel<sup>7</sup>. Selain itu imunitas selular juga diduga dapat menyebabkan sel tumor menjadi apoptosis dan nekrosis<sup>1</sup>.

## **BAHAN DAN CARA**

### **Populasi dan Sampel**

Populasi pada penelitian ini adalah populasi pasien yang memeriksakan atau mengirimkan hasil operasi ke Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta dan Asri Medical Center Yogyakarta pada Januari 2011 sampai Mei 2012. Penetapan besar sampel pada penelitian ini dihitung dari penelitian sebelumnya. Penelitian terdahulu

yang dijadikan sebagai acuan untuk menentukan besar sampel adalah jurnal dengan judul "*Expression Of HIF-1alpha and VEGF in Colorectal Cancer: Association with Clinical Outcomes and Prognostic Implications*". Jurnal tersebut menyatakan  $P_1 = 0,357$ ,  $P_2 = 0,828$ , sehingga jumlah sampel minimal yang bisa dihitung untuk satu kelompok adalah 12. Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2012. Tempat penelitian yang digunakan adalah Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Center Yogyakarta, Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi RS Sardjito Yogyakarta.

## **Preparasi Sampel**

Blok parafin yang telah dikumpulkan, disimpan dalam freezer sampai cukup dingin, selanjutnya dipotong tipis dengan menggunakan mikrotom dengan tebal 4  $\mu\text{m}$ . Setiap blok parafin, dipotong ulang 2 kali untuk pulasan imunohistokimia *Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$* . Sampel blok parafin yang sudah dipotong tipis (4  $\mu\text{m}$ ) dengan mikrotom ditempelkan pada kaca objek. Pada pulasan imunohistokimia *Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$*  digunakan kaca objek yang telah dicoating dengan poly-L-lysine atau Silanized slide agar jaringan dapat menempel pada kaca objek selama proses pulasan imunohistokimia. Cara menempelkan potongan tipis pada kaca objek coated adalah menggunakan ujung pisau atau pinset yang runcing. Potongan tipis dipisahkan dan diratakan dengan

memasukkannya ke dalam air hangat. Setelah mengembang, pindahkan ke atas kaca objek. Selanjutnya, kaca objek diletakkan di atas alat pemanas (hot plate) 50-60<sup>0</sup>C. Setelah parafin melunak, kaca objek dikeringkan dan potongan jaringan siap untuk dipulas. Pulasan imunohistokimia menggunakan metode The EnVision+ Dual Link System kit, teknik pulasan imunohistokimia 2 langkah. Antibodi primer yang digunakan adalah Rabbit Polyclonal Hu-antibody *Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$*  dengan pengenceran 1 : 100.

## **Pemeriksaan ekspresi HIF-1 $\alpha$ dan kematian sel**

Slide/preparat diambil dari arsip Laboratorium Patologi Anatomi Asri Medical Center dan Cito Yogyakarta. Preparat histopatologi dibaca di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas

Muhammadiyah Yogyakarta. Sebelum pembacaan dilakukan label ulang pada preparat sehingga peneliti tidak mengetahui kelompok preparat yang dibaca. Preparat yang dibaca adalah area nekrosis tumor kolorektal dengan mikroskop cahaya. Stadium klinis yang digunakan sesuai dengan stadium *Astler Coller* dan dinilai melalui rekam medis dan hasil pemeriksaan patologi anatomi pasien.

### **Analitik Statistik**

Penelitian ini merupakan penelitian non-eksperimental yang dilakukan dengan mendapatkan data primer dan data sekunder dari Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta. Desain penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*, yaitu jenis penelitian yang pengukuran variabel-variabelnya hanya dilakukan pada satu saat. Metode penelitian ini termasuk

dalam kriteria penelitian analitik kategorik tidak berpasangan, karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi HIF-1 terhadap gambaran histopatologis dan stadium klinis pasien kanker kolorektum.

## **HASIL**

### **A. Karakteristik Subyek**

Penelitian ini menggunakan 30 preparat dengan pewarnaan HIF - 1 $\alpha$  dari 14 perempuan dan 16 laki-laki yang memiliki karakteristik berbeda-beda. Desain penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*, yaitu jenis penelitian yang pengukuran yang pengukuran variabel-variabelnya hanya dilakukan pada satu saat. Metode penelitian ini termasuk dalam kriteria penelitian analitik kategorik tidak berpasangan, karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi HIF-1 $\alpha$  terhadap gambaran histopatologis kematian

sel pada pasien kanker kolorektal. Peneliti melakukan pendataan pada karakteristik subjek yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, hal ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada hubungan antara karakteristik subjek tersebut. Pada hasil analisis dengan uji chi-square didapatkan nilai expected

value kurang dari 5, sehingga uji alternatif yang digunakan untuk tabel 2 x 2 pada penelitian ini adalah uji Fisher. Hasil uji analisis pada tabel didapatkan nilai signifikansi  $p = > 0,05$ , yang berarti tidak terdapat hubungan antara jenis kelamin dan umur dengan ekspresi HIF 1- $\alpha$  pada kanker kolorektal.

Karakteristik	HIF-1 $\alpha$ (+)		HIF-1 $\alpha$ (-)		Total	P	
	Jumlah	Presentase	Jumlah	Presentase		2-sided	1-sided
<b>Jenis Kelamin</b>							
Male	3	10,0%	13	43,3%	16 (53,3%)	0,417	0,283
Female	9	30,0%	9	30,0%	14 (46,7%)		
<b>Umur</b>							
<60	6	20,0%	16	53,3%	22 (73,3%)	1	0,645
>60	2	6,70%	6	20,0%	8 (26,7%)		

dengan ekspresi HIF 1- $\alpha$  pada kanker kolorektal. Adapun karakteristik subjek pada penelitian ini yaitu jenis kelamin dan umur. Karakteristik subjek pada penelitian ini di uji dengan uji chi-square.

0,05, yang berarti tidak terdapat hubungan antara jenis kelamin dan umur dengan ekspresi HIF 1- $\alpha$  pada kanker kolorektal.

## B. Hasil Penelitian

penelitian ini adalah uji Fisher. Hasil uji analisis pada tabel didapatkan nilai signifikansi  $p = >$

Penelitian ini menggunakan uji hipotesis komparatif/asosiatif dengan skala pengukuran ekspresi HIF-1 $\alpha$

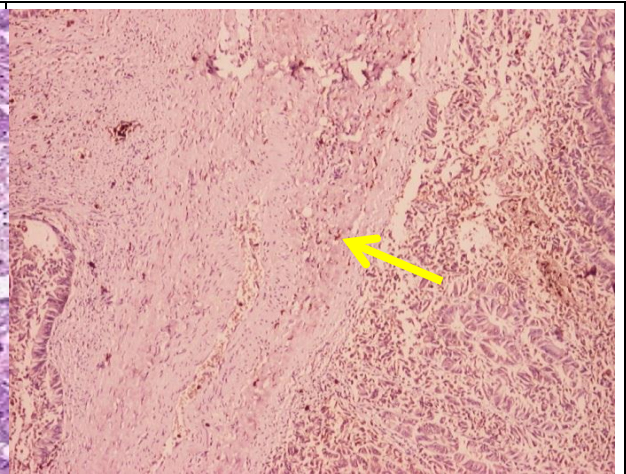
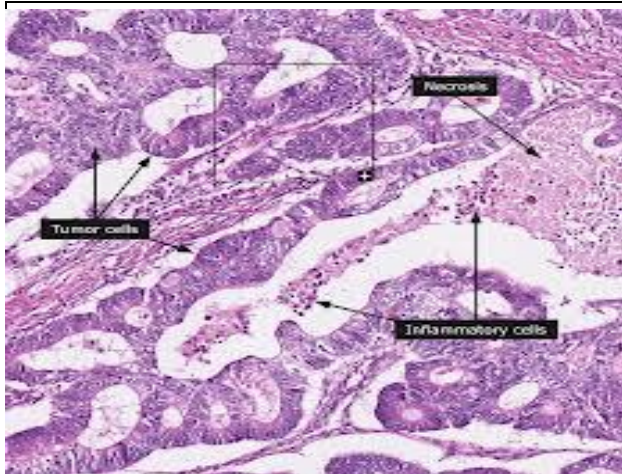
adalah nominal dan kematian sel adalah nominal dengan menggunakan tabel 2 x 3 sehingga uji statistik analisis yang digunakan adalah *uji chi-square* dengan uji alternatif *Fisher*. Pembacaan secara mikroskopis pada preparat ca

colon meliputi pengamatan ekspresi positif dari HIF-1 $\alpha$  yang dihubungkan dengan kematian sel.

Kematian Sel	HIF - 1 $\alpha$ (+)		HIF - 1 $\alpha$ (-)		Nilai <i>p</i>
	Jumlah	Presentase	Jumlah	Presentase	
Positif	6	20,0%	6	20,0%	0.027
Negatif	2	6,7%	16	53,3%	
Total	8	26,7%	22	73,3%	

Pada Tabel 1. Didapatkan nilai  $p = 0.027$  ( $p = < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi HIF-1 $\alpha$  terhadap kematian sel pada kanker kolorektal. Dari data diatas didapatkan ekspresi HIF-1 $\alpha$  positif pada kematian sel yang positif sebesar 6 sampel (20%), kemudian ekspresi HIF-1 $\alpha$  yang positif pada kematian sel yang

negatif sebesar 2 (6,7%), ekspresi HIF-1 $\alpha$  negatif pada kematian sel yang positif sebesar 6 (20%), dan ekspresi HIF-1 $\alpha$  negatif pada kematian sel yang negatif sebesar 16 (53,3%).



Gambar. Kematian sel dengan ekspresi HIF 1 alpha (-)

Gambar. Kematian sel kanker kolorektal dengan Ekspresi HIF 1alpha (+)

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi HIF-1 $\alpha$  terhadap kematian sel pada kanker kolorektal. Hasil uji Chi-Square dan uji alternatif Fisher yang telah dilakukan menunjukkan  $p = 0.027$  ( $p = < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi HIF-1 $\alpha$  terhadap kematian sel pada kanker kolorektal.

Hasil dari penelitian ini sesuai sesuai dengan hipotesis yaitu ekspresi HIF-1 $\alpha$  berbanding lurus dengan peningkatan kematian sel. Hal ini juga diperkuat oleh "*Necrosis Related HIF-1 $\alpha$  Expression Predicts Prognosis in Patient with Endometrioid Endometrial Carcinoma*" oleh Seeber et al. BMC cancer (2010). Di jurnal tersebut juga didapatkan necrosis nilai  $p < 0.0001$  pada HIF-1 $\alpha$  yang berarti bahwa ekspresi HIF-1 $\alpha$



berbanding lurus dengan presentase nekrosis pada pasien dengan endometrial carcinoma. Dimana dijelaskan juga bahwa ekspresi HIF-1 $\alpha$  terutama untuk perinekrotic atau area nekrotik menunjukkan prognosis yang buruk.

Pada jurnal tersebut disebutkan bahwa hipoksia merupakan masalah penting dalam karsinogenesis karena membuat fenotip yang lebih agresif dengan invasi meningkat dan proliferasi, pembentukan metastasis dan kelangsungan hidup yang buruk. Selain itu, sel-sel ganas hipoksia lebih tahan terhadap radioterapi dan kemoterapi. Dalam reaksi terhadap hipoksia, sel-sel akan mengubah metabolisme mereka dan mengaktifkan gen kelangsungan hidup tertentu. Hypoxia Inducible Factor-1

(HIF-1) memainkan peran penting dalam respon seluler adaptif terhadap hipoksia.

Kanker kolon merupakan kanker yang memiliki tahapan kompleks untuk dipahami. Model genetik dari proses kanker kolorektal umumnya mulai dari penampakan *point mutation* K-ras dan kehilangan *allele* berturut-turut pada kromosom 5q (pada kasus kelainan APC), 18 q (DCC), dan 17 p (p53). Beberapa kelainan gen yang sekuensial menunjukkan peran yang penting dalam perkembangan kanker kolorektal<sup>4</sup>.

Pada normoxia, HIF-1 $\alpha$  dihidroksilasi oleh hydroxylases prolyl dalam domain degradasi oksigen. Proses ini dihambat selama hipoksia. Antara lain adalah faktor pertumbuhan, transporter glukosa, glikolitik

enzim, dan gen yang terlibat dalam glukoneogenesis, metabolisme energi fosfat yang tinggi, eritropoiesis, haem metabolisme, besi transportasi, regulasi vasomotor dan sintesis oksida nitrat. Protein produk gen hilir membantu sel untuk bertahan pada hipoksia stres dengan meningkatkan pengiriman oksigen (angiogenesis) dan dengan beralih ke glikolisis anaerobik<sup>6</sup>.

Proses terbentuknya nekrosis adalah berawal dari pembelahan sel tumor yang progresif sehingga menyebabkan kekurangan nutrisi dan oksigen untuk mensuplai jaringan. Kemudian jaringan tersebut beralih ke glikolisis anaerob dan bertahan pada kondisi itu kemudian jaringan tersebut mengalami hipoksia. Jika suplai oksigen

berlangsung tidak memadai, mekanisme tambahan berusaha untuk mengembalikan oksigen atau membantu tubuh beradaptasi dengan hipoksia. Mekanisme-mekanisme lainnya bergantung pada oksigen sensor hydroxylases prolyl (PHDs), yang pralines hydroxylate dalam subunit alpha dari factor transkripsi hypoxia-inducible factor. Perkembangan peradangan sebagai respon terhadap hipoksia secara klinis relevan. Dari peradangan tersebut akan menginduksi TNF  $\alpha$  kemudian dalam keadaan hipoksia tersebut sel dan jaringan akan mati karena tidak mendapat nutrisi maka akan terjadi kematian jaringan atau disebut nekrosis<sup>1</sup>.

Pada kanker dengan proliferasi yang sangat meningkat dengan vaskularisasi

yang tidak mencukupi maka kebutuhan oksigen dan glukosa terbatas. Kemudian sel akan dipaksa memproduksi ATP melalui jalur glikolisis anaerob. Jika anaerob terjadi berkepanjangan maka akan terjadi asidosis, kejadian asidosis dapat menyebabkan influx  $\text{Ca}^{2+}$  oleh *activating acid-sensing ion channel (ASICs)*.  $\text{Ca}^{2+}$  yang terus menerus dapat menstimuli mitokondrial dehidrogenase, yaitu dapat merusak kemampuan sel untuk menekan transport elektron melalui rantai transport elektron selama hipoksia. Kenaikan influks elektron oleh mitokondria dan kenaikan aktivitas enzim dari xanthin oksidase dan NADPH akan memacu pengeluaran ROS (reactive oxygen stimulate) atau yang biasa disebut radikal bebas.

Hipoksia, pengurangan glukosa, asidosis, dan ROS akan menyebabkan kematian sel<sup>8</sup>.

HIF-1 $\alpha$  juga akan menstimulasi aktivasi P53 yang akan memacu terjadinya apoptosis akibat dari kecacatan gen<sup>2</sup>. Hilangnya fungsi dari gen p-53 yang ditemukan pada sebagian besar kanker, dapat meningkatkan level HIF-1 $\alpha$  dan memacu transkripsi yang tergantung oleh HIF pada kanker meningkat. Gen yang cacat dapat memacu aktivitas beberapa enzim seperti PKC dan CPK-K2, di mana kedua enzim ini memicu aktivitas p53 yang akan menimbulkan apoptosis.. Adanya aktivitas p53 ini akan memicu juga aktivitas BAX di mana BAX ini akan menekan aktivitas BCL-2 pada membran mitokondria, sehingga terjadi perubahan permeabilitas

membran dari mitokondria. Perubahan ini mengakibatkan terjadinya pelepasan *cytokrom-C* ke sitosol. Di sitosol, *cytokrom-C* akan mengaktifasi Apaf-1 yang selanjutnya akan mengaktifasi caspase... dan caspase yang aktif ini akan mengaktifkan DNA-se. kemudian DNA-se yang aktif menembus membran inti dan merusak DNA, sehingga DNA sel yang bersangkutan rusak (fragmentasi) dan akhirnya sel mengalami kematian (apoptosis)<sup>2</sup>.

Respon selular yang disebabkan oleh hipoksia dimediasi oleh aksi transkripsi faktor HIF-1 $\alpha$ . Kemudian HIF-1 $\alpha$  mengikat elemen hipoksia dalam promotor berbagai target gen. gen-gen yang diinduksi hipoksia diatur dalam proses biologis yang penting, termasuk

apoptosis atau kematian jaringan, migrasi (metastasis), proliferasi sel, angiogenesis, dan metabolisme glikolitik. Perubahan pola-pola dari gen-gen tersebut, menetralkan hipoksia dan menaikkan oksigenasi, sedangkan yang lain mempengaruhi adaptasi seluler untuk mengurangi konsentrasi oksigen atau memediasi sinyal kematian sel<sup>7</sup>.

Pengamatan secara mikroskopis langsung didapatkan ekspresi HIF-1 $\alpha$  positif pada kematian sel yang positif sebesar 6 sampel (20%), kemudian ekspresi HIF-1 $\alpha$  yang positif pada kematian sel yang negatif sebesar 2 (6,7%), ekspresi HIF-1 $\alpha$  negatif pada kematian sel yang positif sebesar 6 (20%), dan ekspresi HIF-1 $\alpha$  negatif pada kematian

sel yang negatif sebesar 16 (53,3%).

### **Kesimpulan**

Penelitian mengenai hubungan ekspresi *hypoxia inducible factor* (hif) 1- $\alpha$  terhadap kematian sel kanker kolorektal, setelah dilakukan pembacaan secara mikroskopis dan dianalisis menggunakan program statistik dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil uji statistik didapatkan nilai signifikansi ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi HIF-1 $\alpha$  terhadap gambaran histopatologi kematian sel pada kanker kolorektal.
2. Pada hasil uji didapatkan kematian sel positif pada HIF-1 $\alpha$  positif didapatkan sebanyak 6 buah (20%), pada kematian sel yang positif pada HIF-1 $\alpha$

negatif sebanyak 6 buah (20%), kematian sel yang negatif pada HIF-1 $\alpha$  positif didapatkan 2 buah (6,7%), dan kematian sel yang negatif pada HIF-1 $\alpha$  negatif sebanyak 16 buah (53,3%).

### **Saran**

1. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar dan mencakup populasi yang lebih luas (tidak hanya terbatas di satu laboratorium) sehingga hasilnya dapat memberikan gambaran yang lebih baik dan lebih bermakna.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kematian sel yang disebabkan oleh apoptosis maupun kematian sel yang disebabkan oleh hipoksia (nekrosis) untuk mengetahui mekanisme dari hubungan Hif-1

alpha dan kematian sel karena hipoksia pada kanker kolorektal.

3. Perlu diketahui latar belakang keilmuan klinisi karena hal tersebut dapat mempengaruhi proses penelitian yang meliputi perlakuan serta pengecetan sample HIF-1 $\alpha$  yang dapat berdampak terhadap keakuratan hasil penelitian.

#### Daftar Pustaka

1. Baratawidjadja, K.G, & Iris Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar Edisi 9*. Balai Penerbit FKUI: Jakarta.
2. Greijer, A.E., & E van der Wall. 2004. *The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis*. Journal Clinical Pathology. 57, 1009–1014.
3. International Agency for Research on Cancer. 2008. *Colorectal Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008*. Diakses 8 April 2013 dari <http://globocan.iarc.fr/factsheet/cancers/colorectal.asp>
4. Kanazawa, T., Watanabe, T., Kazama, S., Tada, T., Koketsu, S., & Nagawa, H. 2002. Poorly Differentiated Adenocarcinoma and Mucinous Carcinoma of the Colon and Rectum Show Higher Rates of Loss of Heterozygosity and Loss of E-Cadherin Expression due to Methylation of Promoter Region. *Int J Cancer*. 102: 225–229.
5. Maxwell, P. 2005. Hypoxia-inducible Factor As a Physiological Regulator. *Experimental and Physiology*. 90: 791-797. Diakses pada tanggal 16 Februari 2012 dari <http://ep.physoc.org/content/90/6/791.full>
6. Seeber, Laura M.S., Nicole Horr e, Petra van der Groep, Elsken van der Wall, René HM Verheijen1 and Paul J van Diest. 2010. *Necrosis related HIF-1 $\alpha$  expression predicts prognosis in patients with endometrioid endometrial carcinoma*. BMC cancer. 307 (10), 1471-2407.
7. Vleugel, M.M., A E Greijer., A Shvarts., P van der Groep., M van Berkel., Y Aarbodem., H van Tinteren., A L Harris., P J van Diest., E van der Wall. 2005. *Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 $\alpha$  expression in invasive breast cancer*. Journal Clinical Pathology. 58, 172–177.
8. Zong, Wei-Xing., & Craig B Thompson. 2006. *Necrotic Death as a Cell Fate*. Genes & Development. 20, 1-15.