



**Kombinasi Ekspresi Vimentin, E-Cadherin, CD44 dan CD24 sebagai Model Prediktor
Respons Kemoterapi Neoajuvan Berbasis Antrasiklin pada Kanker Payudara Stadium
IIIB Subtipe Luminal**

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor



Oleh :

MOCHAMAD BACHTIAR BUDIANTO

107070100111007

**PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
MINAT BIOMEDIK**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



DISERTASI

KOMBINASI EKSPRESI VIMENTIN, E-CADHERIN, CD44 DAN CD24 SEBAGAI MODEL PREDIKTOR RESPONS KEMOTERAPI NEOAJUVAN BERBASIS ANTRASIKLIN PADA KANKER PAYUDARA STADIUM IIIB SUBTYPE LUMINAL

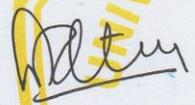
Oleh:

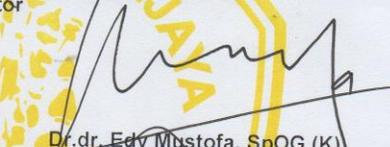
MOCHAMAD BACHTIAR BUDIANTO

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal : 30 Juli 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat

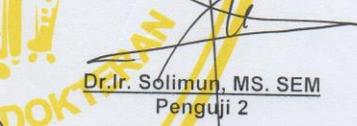
Komisi Pembimbing,

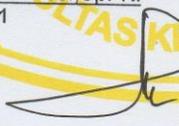

Prof. Dr. dr. Bambang Pardijanto, SpB., SpBP-RE.(K).
Promotor


Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes.
Ko-Promotor 1


Dr. dr. Edy Mustofa, SpOG.(K).
Ko-Promotor 2


Prof. Dr. dr. Kusworini, M. Kes., SpPK.
Penguji 1


Dr. Ir. Solimun, MS. SEM
Penguji 2


Dr. dr. Desak Gede Agung Suprabawati, SpB.(K).Onk.
Penguji Luar

Malang,

Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan



Dr. dr. Sri Andarini, M. Kes.
NIP195804111987012001

**IDENTITAS PENGUJI****JUDUL DISERTASI:**

Kombinasi Ekspresi Vimentin, E-Cadherin, CD44 dan CD24 sebagai Model Prediktor Respons Kemoterapi Neoajuvan Berbasis Antrasiklin pada Kanker Payudara Stadium IIIB Subtipe Luminal

Nama Mahasiswa : Mochamad Bachtiar Budianto

NIM : 107070100111007

Program Studi : Program Doktor Ilmu Kedokteran

Minat : Biomedik

KOMISI PROMOTOR

Promotor : Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, SpB, SpBP-RE(K)

Ko promotor 1 : Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes

Ko promotor 2 : Dr. dr. Edy Mustofa, SpOG(K)

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Dr. dr. Desak Suprabawati, SpB(K)Onk

Dosen Penguji 2 : Prof. Dr. dr. Koesworini Handono, MKes, SpPK(K)

Dosen Penguji 3 : Dr. Ir. Solimun, MS, SEM

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.



Malang, 30 Juli 2018
Mahasiswa,

Nama : Mochamad Bachtiar Budianto
NIM : 107070100111007
PS : Doktor Ilmu Kedokteran
Fak : Kedokteran UB





KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atau Tuhan YME, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyelesaikan disertasi atau disertasi yang berjudul: Kombinasi Ekspresi Vimentin, E-Cadherin, CD44 dan CD24 sebagai Model Prediktor Respons Kemoterapi Neoajuvan pada Kanker Payudara Stadium IIIB Subtipe Luminal

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi keterkaitan antara indikator progresifitas kanker payudara dengan berbagai perubahan penanda biomolekuler yang akan dikaji potensinya terhadap variasi respons pasca pemberian kemoterapi neoajuvan pada kanker payudara stadium lanjut.

Dengan selesainya paper Ujian Tertutup ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Brawijaya
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
3. Ketua Program Studi
4. Promotor, Ko-promotor 1 dan 2
5. Penguji tamu dan penguji luar
6. Pembimbing akademik dan evaluator pada kegiatan Seminar Pra-proposal
7. Kepala instansi, kepala departemen atau kepala bagian
8. Pihak lain yang membantu dan terlibat dalam penelitian dan penulisan disertasi
9. Subyek penelitian
10. Keluarga



11. Tenaga Administrasi dan pihak lain yang turut membantu

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 30 juli 2018

Penulis



RINGKASAN

Kanker payudara adalah salah satu kanker paling banyak pada wanita dengan 1,3 juta kasus dan 450.000 kematian setiap tahun di seluruh dunia, sementara di Indonesia tidak ada data yang cukup baik. Perkembangan kanker payudara sangat bervariasi dari stadium in situ, karsinoma invasif sampai ke karsinoma metastasis. Di antara penderita yang terkena kanker payudara, hanya 60% yang bisa diterapi dengan baik, sementara sekitar sepertiga meninggal karena komplikasi dan metastasis. Perlu dipahami bahwa 60-70% kasus kanker baru pasien kanker payudara datang dalam stadium lanjut dan metastasis. Stadium kanker payudara terbanyak adalah stadium IIIB, yaitu sebesar 65%, metastasis mempunyai peran penting pada tingginya tingkat kematian kasus kanker secara umum.

Ketidakeimbangan antara onkogen dan gen supresor tumor dianggap sebagai jalur seluler utama yang mengatur proliferasi, diferensiasi, apoptosis dan respons terhadap kerusakan genetik. Mutasi germline dalam gen E-cadherin mempengaruhi penyebaran kanker dan berhubungan dengan prognosis yang buruk. Selain itu hilangnya fungsi E-cadherin menyebabkan perubahan dari tumor jinak (adenoma) menjadi tumor invasif lebih cepat dan terjadinya metastasis karsinoma. Sebagai hasil dari penghambatan E-cadherin selama proses aktivasi *epithelial to mesenchymal transition* (EMT), yaitu proses perubahan fenotipe epitelial menjadi fenotipe mesenkhimal yang sangat penting dalam terjadinya progresifitas dan metastasis sel kanker, pada saat yang sama juga peningkatan ekspresi Vimentin dikaitkan dengan peningkatan grading sel tumor, tingkat invasi dan metastasis yang lebih tinggi. Protein Vimentin ini dianggap sebagai indikator perkembangan kanker. Selain peningkatan ekspresi vimentin dan penurunan E-cadherin, populasi CD44 yang tinggi dan CD24 rendah juga disebutkan sebagai karakteristik EMT. Lebih dari itu ekspresi populasi CD44 yang tinggi dan CD24 yang rendah terkait dengan resistensi kemoterapi. Beberapa penanda aktivasi EMT yang telah dijelaskan tersebut adalah protein-protein yang merupakan bagian dari mekanisme perkembangan kanker yang berhubungan dengan EMT.

Saat ini diketahui bahwa terdapat interaksi genetik kanker, yaitu keadaan saling mempengaruhi antar gen yang mengalami mutasi, interaksi antara gen-gen tersebut akan menghasilkan satu produk fenotif dan aktifitas yang berbeda. Demikian pula dengan protein dapat berinteraksi dengan banyak jenis molekul. Interaksi ini dapat berupa intermolekular (antara protein dan bagian yang melekat secara kovalen) atau intramolekul (interaksi protein non-kovalen dengan molekul lain). Interaksi semacam itu terkait dengan fungsi mereka dan karena itu merupakan obyek studi dalam biologi molekular. Penghantaran sinyal di dalam sel tergantung pada interaksi protein dengan protein (PPI) antara berbagai molekul sinyal. Rekrutmen jalur sinyal melalui PPI disebut transduksi sinyal dan memainkan peran mendasar dalam banyak proses biologis dan dalam banyak penyakit termasuk kanker. Sehingga dimungkinkan logika ilmiah bahwa keempat protein prediktor tersebut di atas mempunyai nilai berbeda pada saat bekerja bersama-sama dibandingkan saat bekerja sendiri-sendiri. Karena itu analisis kombinasi protein penanda Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 ini diharapkan dapat dipakai sebagai prediktor respons kemoterapi neoajuvan yang lebih baik.

Prosedur kemoterapi yang dilakukan saat ini masih banyak didapati resistensi dan respons kemoterapi yang buruk. Demikian pula kemoterapi saat ini belum memiliki indikator biomolekul yang tepat sebagai pertimbangan dalam keputusan pemberian kemoterapi,



sehingga kemanjuran kemoterapi belum dapat dinilai secara efektif. Sehingga diharapkan dengan dilakukan studi komprehensif untuk melihat tingkat korelasi dari masing-masing studi penanda biologis potensial Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat dipakai sebagai prediktor perkembangan kanker payudara setelah kemoterapi neoadjuvan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi kemungkinan kombinasi ekspresi potensial dari vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat dipakai sebagai model prediktor dari perkembangan kanker payudara setelah pemberian kemoterapi neoadjuvan.

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif analitik dengan pendekatan pre-post study, dimana peneliti akan melihat perubahan parameter yang diukur setelah pemberian kemoterapi en kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal. Kemudian hasilnya akan dianalisis untuk menentukan potensi e-cadherin, Vimentin, CD44 dan CD24 sebagai penanda invasi dan kemampuan metastatik sel kanker untuk paparan kemoterapi ajuvan pada pasien kanker payudara di dr. Saiful Anwar Malang. Pemilihan subyek penelitian menggunakan teknik *accidental sampling* mulai di mana pendekatan ini mencakup metode untuk memilih pasien yang dirawat di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang yang telah memenuhi kriteria sebagai subyek penelitian dengan menandatangani *informed consent*. Kemudian mengukur ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dari jaringan kanker payudara sebelum kemoterapi menggunakan pemeriksaan imunohistokimia yang akan menganalisis gambar yang dilihat dengan mikroskop untuk memastikan ekspresi immunostaining di dalam inti sel atau di sitoplasma. Prosedur ini akan dilakukan sebelum pemberian kemoterapi neoadjuvan, kemudian setelah siklus ketiga kemoterapi respons klinis pasien dinilai dengan mengukur perubahan ukuran tumor.

Hasil penelitian ini semua faktor diskriminan (Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24) menunjukkan variasi fungsi yang signifikan (p .value 0,000) untuk digunakan sebagai prediktor respon kemoterapi neoadjuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal dengan nilai korelasi kanonik 0899. Keempat variabel independen memberikan kontribusi 80,82% untuk penentuan respons kemoterapi neoadjuvan berbasis antrasiklin yang diperoleh dari nilai kuadrat korelasi kanonik. Vimentin adalah prediktor respon kemoterapi terkuat dengan nilai -0,697, berturut-turut diikuti oleh CD24 (0,529), E-cadherin (0,525) dan CD44 terlemah (0,487). Meskipun Vimentin secara statistik terbukti sebagai prediktor terkuat dalam menentukan respon terhadap kemoterapi, tetapi jika dipelajari dalam distribusi data peserta, peningkatan ekspresi Vimentin di atas 50% tidak selalu menunjukkan tidak ada respon terhadap kemoterapi. Ada beberapa partisipan menunjukkan ekspresi Vimentin di bawah 50% namun menunjukkan respons progresif. Selain itu, ekspresi E-cadherin pada beberapa partisipan yang menunjukkan ekspresi 100% tapi menunjukkan respons parsial, sementara ada partisipan yang menunjukkan ekspresi E-cadherin yang lebih rendah tapi menunjukkan respon komplit. Variasi respons juga terlihat pada hasil CD44, di mana respon parsial dan respon komplit tidak terlihat pada partisipan dengan ekspresi CD44 yang lebih tinggi, dan ini berbeda dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa CD44 adalah protein transmembran yang terlibat dalam inisiasi, metastasis dan agresivitas tumor. CD24 adalah protein penanda sel yang perlahan membelah. Konsep ini dikaitkan dengan resistensi kemoterapi karena kemoterapi hanya bekerja pada sel yang aktif membelah cepat. Oleh karena itu agresivitas sel kanker dan sifat lambat pembelahan sel dalam kasus kanker payudara hampir selalu dikaitkan dengan ekspresi CD44 dan CD24. Keseluruhan konsep teoritis yang mendasari aktifitas setiap parameter yang diukur dalam penelitian ini akan berbeda ketika dianalisis secara sendiri-sendiri dengan bila dianalisis secara bersamaan dalam rekonstruksi model prediktor respons kemoterapi seperti pada hasil penelitian ini. Skor akurasi 97% dan sensitivitas 100% dari empat variabel gabungan sebagai model prediktor respons kemoterapi menunjukkan bahwa model ini sangat kuat untuk aplikasi klinis. Penjelasan mengenai alasan perbedaan dalam aktifitas keempat variabel ketika diteliti secara sendiri-sendiri dengan bila diperiksa secara bersama-sama dalam penelitian ini masih merupakan Black Box yang masih



mempunyai korelasi yang signifikan. Penelitian ini membutuhkan kajian-kajian untuk melihat aktifitas keempat variabel ketika dikombinasikan secara biomolekuler. Pendekatan studi cross-sectional yang digunakan dalam penelitian ini menjelaskan bahwa keempat variabel saling terkait untuk menentukan respon kemoterapi dan menunjukkan perbedaan dalam aktifitas bila dibandingkan dengan analisis terpisah dari setiap aktivitas variabel. Secara ilmiah kemungkinan bahwa keempat protein prediktif ketika hadir dalam sel-sel tubuh pasien akan bekerja secara saling terkait dan mempengaruhi, sehingga kombinasi parameter ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 sebagai model prediktor keseluruhan sangat mungkin untuk digunakan sebagai satu predictor untuk pedoman pemberian kemoterapi neoajuan pada kanker payudara.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat digunakan sebagai model prediktor respons kemoterapi neoajuan pada kanker payudara stadium IIB sub tipe Luminal di RSUD dr. Saiful Anwar Malang.



SUMMARY

Breast cancer is one of the most cancer cases in women with 1.3 million cases and 450,000 deaths each year in almost all over the world, while in Indonesia there is no good data. The development of breast cancer varies greatly from stadium in situ, invasive carcinoma metastatic to the metastatic carinoma. Among those affected by breast cancer, only 60% could be treated well, while approximately one-third died from complications and metastasis. Aproximately 60-70% of new cancer patients detected in advanced stage with metastatic conditions. Most breast cancer stage is stage IIIB, which is equal to 65%. And metastasis have contributed to the death rate of cancer cases in general. There are several predictive factors of chemotherapy response, recurrence and survival in breast cancer. These include tumor size, axillary nodal status, histopathology type and grading, steroid receptors (ER, PR), In addition, the presence of the HER-2, Ki67 and some expression protein in immunohistochemistry have correlated with disease-free interval, survival, and chemotherapy response in breast cancer. However, there are still many unsatisfactory breast cancer therapies, so the discovery of predictors of appropriate chemotherapy response is crucial.

The imbalance between oncogenes and tumor suppressor genes is considered a key cellular pathways that regulate the ability of proliferation, differentiation, apoptosis and response to genetic damage. Germline mutations in the e-cadherin gene predispose to the spread of cancer and is associated with a poor prognosis. Besides the loss of e-cadherin function causes a change from a benign tumor (adenoma) into invasive tumors faster and occurrence of metastatic carcinoma. As a result of the repression of E-cadherin during the activation process of epithelial to mesenchymal transition (EMT), the process of changing the epithelial phenotype into a mesenchymal phenotype that is very important in the occurrence of progresifitas and metastasis of cancer cells, at the same time it is also an increase in vimentin expression is associated with a higher grading of tumor cells, invasion and metastasis so that the protein is considered to be an indicator of cancer progression. In addition to the increase of the expression of vimentin and decreased e-cadherin, population of high CD44 and CD 24 low is also mentioned as a characteristic of EMT. Over expression of CD44 high population and low CD24 resistancy associated with chemotherapy.

Several markers of activation of EMT that has been described as part of the mechanism of cancer progression, which is still only explain the correlation with EMT and no cut off point yet in previous studies. Chemotherapy procedures still did not have an indicator biomolecular as a consideration in the decision of chemotherapy, so that the efficacy of chemotherapy can not be assessed effectively. Therefore a comprehensive study to look at the level of correlation of each of the biological marker studies on the potential predictors vimentin, e-cadherin, CD44, CD24 as a predictor of breast cancer progression and neoajuvan chemotherapy become very important.

It is now known that there is a genetic interaction of cancer, the mutual state of mutations between mutated genes, the interaction between the genes will result in a different phenotypic product and activity. Similarly, proteins can interact with many types of molecules. These interactions may be intermolecular (between proteins and covalently attached parts) or intramolecules (interactions of non-covalent proteins with other molecules). Such interactions are related to their function and are therefore the object of study in molecular biology. Delivery of signals within cells depends on the interaction of proteins with proteins (PPIs) between the various signal molecules. Recruitment of signal pathways through PPIs is called signal



transduction and plays a fundamental role in many biological processes and in many diseases including cancer. So it is possible that scientific logic that the four predictor proteins mentioned above have different values when working together than when working alone. Therefore, the analysis of the combination of protein markers Vimentin, E-cadherin, CD44 and CD24 is expected to be used as a predictor of neoadjuvant chemotherapy response better.

The purpose of this study is to explore the potential expression combination of Vimentin, E-cadherin, CD44 and CD24 as a predictor model of breast cancer progression after the administration of neoadjuvant chemotherapy.

Design research used in this research is descriptive analytic approach pre-post test study, which the researchers will look at changes in the parameters measured after administration of chemotherapy in breast cancer stage IIIB patients Luminal subtype. Then results will be analyzed to determine the potential of Vimentin, E-cadherin, CD44 and CD24 as a marker of invasion and metastatic ability of cancer cells to exposure to adjuvant chemotherapy in breast cancer patients in dr. Saiful Anwar Malang. Selection of study subjects using the technique of accidental sampling began the period October 2016 - February 2017 in which this approach embraces a method to select patients in the room or in poly outpatient dr. Saiful Anwar Malang who have met the criteria as the subject of research by signing the informed consent in advance during periode predetermined. Measuring the expression of E-cadherin, Vimentin, CD44 and CD24 of breast cancer tissue before chemotherapy using immunohistochemistry examination results will analysis image captures microscope to make sure the expression is contained in the cell nucleus or in the cytoplasm. This procedure will be obtained before administration of neoadjuvant chemotherapy well, because after the third phase of chemotherapy in general clinical response of patients showed a change based on the size of the tumor.

The results demonstrated that all discriminant factors (Vimentin, E-cadherin, CD44 and CD24) show significant variation of function (p.value 0.000) to be used as a predictor of anthracycline-based postchemotherapy response in stage IIIB luminal breast cancer patients with a canonical correlation value of 0.899. The four independent variables contributed 80.82% to the determination of 3 cycles anthracycline based neoadjuvant chemotherapy response obtained from the quadratic value of canonical correlation. Vimentin was the strongest predictor of chemotherapy response with a value of -0.697, successively followed by CD24 (0.529), E-cadherin (0.525) and the weakest CD44 (0.487). Although Vimentin statistically demonstrated as the strongest predictor in determining the response to chemotherapy, but if studied in the participants data distribution, an increase in Vimentin expression above 50% did not necessarily indicate no response to chemotherapy. There were some participants showing Vimentin expression below 50% instead of providing a progressive response. Moreover, E-cadherin expression in some participants showing 100% only indicated partial response, while participants showing lower E-cadherin expression actually indicated complete response¹¹. Response variation was also seen in the results of CD44, where partial response and complete response were precisely seen in participants with higher CD44 expression, and this is in contradiction with the previous journal publication which states that CD44 is a transmembrane protein involved in initiation, metastatic and aggressiveness of the tumor. CD24 is a marker protein of slowly dividing cells. This concept is associated with chemotherapy resistance considering the chemotherapy drug effect is more appropriate and will give good results if given in the tumor progression phase or rapidly dividing cells as has been discussed in the previous section. Therefore, the aggressiveness and the slow nature of cell division in cases of breast cancer are almost always associated with CD44 and CD24 expression. The overall theoretical concepts underlying the activity of each parameter measured in this study would be different when analyzed separately and when studied simultaneously in a reconstruction of a predictor model of anthracycline-based chemotherapy response as in the results of this study. The accuracy score of 97% and the sensitivity of 100% of the four combined variables as a predictor



model of chemotherapy response suggest that this model is highly potent for clinical application. The explanation of the reasons for the differences in the activity of the four variables when studied separately based on prior publication with the combination of the four variables in this study is still a Black Box which still requires further studies to see the activities of the four variables when combined biomolecularly. The cross-sectional study approach used by the researchers in this study explains that the four variables are interrelated to determine the chemotherapy response and shows the difference in activity when compared with the separate analysis of each variable activity. It is scientifically possible that these four predictive proteins when present in the patient's body cells will work in mutually interrelated and influencing manner, so that the combination of Vimentin, E-cadherin, CD44 and CD24 expression parameters as a whole predictor model is highly likely to be used as one of the guidelines for administration of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.

In conclusion, combination of expression Vimentin, E-cadherin, CD44 and CD24 can be used as a model of predictor of breast cancer progression after chemotherapy neoadjuvant clinically thus enabling used as the prediction of chemotherapy response and recurrences.



DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan masalah	5
1.3. Tujuan	6
1.4. Manfaat	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Progresifitas kanker payudara	8
2.2. Subtipe molekuler kanker payudara	10
2.3. Stadium kanker payudara	13
2.4. Kemoterapi dan respons kemoterapi	19
2.5. Faktor prognostik dan faktor prediktif kanker payudara	29
2.6. EMT (epithelial to mesenchymal transtition)	31
2.7. Peranan EMT pada tahap metastasis	37
2.8. EMT dan resistensi kemoterapi	44
2.9. Peranan protein CD44 dan CD24 pada EMT dan resistensi	44



2.10. Kemoterapi neoajuvan antrasiklin dan EMT	49
2.11. Interaksi protein	51
2.12. Interaksi genetik	56
2.13. Kerangka teori	58
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	61
3.1. Kerangka konsep penelitian	61
3.2. Hipotesis penelitian	63
BAB IV. METODE PENELITIAN	65
4.1. Desain penelitian	65
4.2. Lokasi dan waktu penelitian	66
4.3. Populasi penelitian	67
4.4. Kriteria subyek penelitian	68
4.5. Besar sampel	69
4.6. Cara pengambilan sampel	70
4.7. Variabel penelitian	70
4.8. Definisi operasional	71
4.9. Prosedur pemeriksaan	75
4.10. Alur penelitian	76
4.11. Pelaksanaan penelitian	76
4.12. Analisis data	78
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	82
5.1. Karakteristik pasien partisipan	81
5.2. Analisis uji asumsi	84
5.3. Statistik diskriptif data penelitian	85
5.4. Analisis uji hipotesis	93
BAB VI. PEMBAHASAN	105



6.1. Karakteristik sampel penelitian.....	105
6.2. Ekspresi Vimentin.....	110
6.3. Ekspresi E-cadherin.....	113
6.4. Ekspresi CD44.....	117
6.5. Ekspresi CD24.....	119
6.6. Potensi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 sebagai prediktor respons kemoterapi neoajuvan.....	126
BAB VII: PENUTUP.....	126
7.1. Simpulan.....	126
7.2. Saran-saran.....	127
DAFTAR PUSTAKA.....	128
LAMPIRAN.....	141



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Subtipe kanker payudara.....	11
Tabel 2.2.	Grouping stadium.....	17
Tabel 4.1.	Klasifikasi kanker payudara molekular subtipe	66
Tabel 4.2.	Respons kemoterapi.....	75
Tabel 5.1.	Karakteristik pasien partisipan.....	77
Tabel 5.2.	Hasil uji normalitas data.....	79
Tabel 5.3.	Ekspresi Vimentin jaringan kanker payudara stadium IIIB.....	81
Tabel 5.4.	Ekspresi E-cadherin jaringan kanker payudara stadium IIIB.....	83
Tabel 5.5.	Ekspresi CD44 jaringan kanker payudara stadium IIIB.....	85
Tabel 5.6.	Ekspresi CD24 jaringan kanker payudara stadium IIIB.....	87
Tabel 5.7.	Hasil chi-square test hubungan ekspresi Vimentin.....	88
Tabel 5.8.	Hasil chi-square test hubungan ekspresi E-cadherin	89
Tabel 5.9.	Hasil chi-square test hubungan ekspresi CD44.....	90
Tabel 5.10.	Hasil chi-square test hubungan ekspresi CD24	91

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1. Kemoterapi ajuvan dan neoajuvan	24
Gambar 2.2. Gambaran sel epitel dan mesenkim	32
Gambar 2.3. Mekanisme invasi sel pada progresi tumor	34
Gambar 2.4. Hubungan klinis marker dengan EMT	42
Gambar 2.5. Representasi jalur signaling yang di induksi oleh CD 44	45
Gambar 2.6. Mekanisme EMT pada resistensi kemoterapi	49
Gambar 2.7. Kerangka Teori	57
Gambar 3.1. Kerangka Konsep	60
Gambar 4.1. Bagan hubungan antar variable	69
Gambar 4.2. Alur penelitian	74
Gambar 5.1. Ekspresi Vimentin pada jaringan kanker payudara	80
Gambar 5.2. Ekspresi E-cadherin pada jaringan kanker payudara	82
Gambar 5.3. Ekspresi CD44 pada jaringan kanker payudara	85
Gambar 5.4. Ekspresi CD24 pada jaringan kanker payudara	87



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Keterangan Kelaikan Etik	140
Lampiran 2	Sertifikat Bebas Plagiasi	141
Lampiran 3	Lembar Pengumpulan Data	142
Lampiran 4	Surat Persetujuan	143
Lampiran 5	Data Penelitian yang Dianalisis	144
Lampiran 6	Hasil Analisis Data Usia	146
Lampiran 7	Hasil Analisis Grading	147
Lampiran 8	Hasil Analisis KGB	149
Lampiran 9	Hasil Analisis Metastasis	150
Lampiran 10	Hasil Analisis Respons	151
Lampiran 11	Hasil Analisis Vimentin	152
Lampiran 12	Hasil Analisis E-cadherin	153
Lampiran 13	Hasil Analisis CD44	155
Lampiran 14	Hasil Analisis CD24	156
Lampiran 15	Hasil Analisis Diskriminan	157
Lampiran 16	Hasil Analisis <i>Fisher's linear discriminant</i>	167



DAFTAR SINGKATAN

ATP	: adenosine triphosphate
Bcl 2	: B-cell lymphoma 2
bHLH	: basic helix-loop helix
BMP	: bone morphogenetic protein
CAF	: cancer-associated fibroblast
CD	: cluster of differentiation chromosome
CPA	: cyclophosphamide
CSN2	: COP9 signalosome 2
CSV	: cell surface vimentin
CTC	: circulating tumor cells
CTL	: cytotoxic ligand
DC	: dendritic cell
DDR	: discoidin domain receptor
DNA	: deoxyribonucleic acid
E-cadherin	: epithelial cadherin
ECM	: extracellular matrix
ECM	: extracellular matrix
EGF	: epidermal growth factor
EGFR	: epidermal growth factor receptor
EMT	: endothelial to mesenchymal transition
EMT	: epithelial-mesenchymal transition
EndoEMT	: endothelial-mesenchymal transition
EpCAM	: epithelial cell adhesion molecule
ER	: estrogen receptor
ER	: estrogen receptor
FAK	: focal adhesion kinase
FAS	: Fc fusio protein
FGF	: fibroblast growth factor
FOXC2	: forkhead box C2



FSP	: fibroblast-specific protein
GEM	: gemcitabine
GSK-3 β	: glycogen synthase kinase 3 β
HDAC	: histone deacetylase
HER-2	: human EGFR-2
HER2/c-erbB-2	: human epidermal growth factor 2
HGF	: hepatocyte growth factor
HIF	: hypoxia-inducible factor
HMGB1	: high mobility group box 1
IDC	: invasive ductal carcinoma
IFN- γ	: interferon- γ
IgG	: immunoglobulin G
IL	: interleukin
ILC	: invasive lobullar carcinoma
ILK	: integrin-linked kinase
IPF	: idiopathic pulmonary fibrosis
LEF-1	: lymphoid enhancer factor 1
LOX	: lysyl oxidase
MAPK	: mitogen-activated of the protein kinase B
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MCF 7	: human breast adenocarcinoma cell line
MDSC	: myeloid-derived suppressor ell
MDSCs	: myeloid-derived suppressor cells
MET	: mesenchymal-epithelial transition
miRNA	: micro RNA
MMP	: matrix metalloproteinase
NK cell	: natural killer cells
PBMC	: pberipheral blood mononuclear cells
PDGF	: platelet derived growth factor
PGE2	: prostaglandin E2
PI3K	: phosphoinositide-3-kinase
PR	: progesterone receptor
PR	: progresteron receptor
PTEN	: phosphatase and tensin homolog deleted on



PX	: <i>paclitaxel</i>
RNA	: <i>ribonucleid acid</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
RTK	: <i>receptor tyrosine kinase</i>
SMA	: <i>smooth muscle actin</i>
Sos	: <i>son of sevenless</i>
STAT 3	: <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T. reg.	: <i>T regulator cell</i>
TAM	: <i>tumor associated macrophage</i>
TAM	: <i>tumor-associated macrophages</i>
TCF	: <i>T-cell factor</i>
TGF	: <i>transforming growth factor</i>
TGF- β	: <i>transforming growth factor beta.</i>
Th 1	: <i>T helper 1</i>
TLR4	: <i>toll like ligand receptor 4</i>
TNBC	: <i>Triple Negative Breast Cancer</i>
TNBC	: <i>triple-negative breast cancer</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNF- α	: <i>tumor necrosis factor -α</i>
TP 53	: <i>tumor protein p53</i>
UTR	: <i>untranslated region</i>
VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>
ZEB	: <i>zinc finger E-box binding</i>
ZEB	: <i>zinc finger E-box binding</i>
ZO-1	: <i>zonula occludens-1</i>
α SMA	: <i>alpha-smooth muscle actin</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Kanker payudara adalah kanker yang paling sering dijumpai pada wanita, banyak menyebabkan kematian dan mempunyai insiden terus yang meningkat dari waktu ke waktu.

Menurut *The American Cancer Society Cancer Facts and Figures* (2017) di Amerika Serikat diperkirakan kasus baru kanker payudara 1,688,780 orang dan 600,920 orang wanita meninggal karenanya (Rebecca *et al.*, 2017). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) tahun 2013, kanker terbanyak pada perempuan di Indonesia adalah kanker payudara dan kanker leher rahim. Sedangkan berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2010, kasus rawat inap kanker payudara berjumlah 12.014 kasus (28,7%). Pada tahun 2013 didapatkan 61.000 kasus baru kanker payudara (Kemenkes RI, 2015). Data dari *Jakarta Cancer Registry* menunjukkan bahwa kanker payudara merupakan kanker dengan insiden tertinggi yaitu 18.6 per 100.000 penduduk pertahun (Wahidin *et al.*, 2012).

Kanker payudara stadium lanjut lokal IIIB di Indonesia menduduki tempat terbanyak sekitar 65 %, dimana dari keseluruhan subtype molekuler yang terbanyak adalah subtype Luminal yang diperkirakan sebesar 60 %. Kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin banyak dan lazim digunakan sebagai terapi kanker payudara stadium lanjut lokal, kemoterapi neoajuvan diberikan sebanyak 3 – 4 kali sebelum pembedahan. Dengan kemoterapi ini masih banyak kasus yang menunjukkan tidak respons, dimana tingkat resistensi dan kekambuhan masih cukup besar, di sisi lain kemoterapi juga dapat menjadi pemicu pertumbuhan tumor sekunder jenis lain pada kelompok wanita usia muda (Genevieve *et al.*, 2011). Kemoterapi berbasis antrasiklin diberikan pada semua kasus kanker payudara tanpa diketahui prediksi apakah terapi neoajuvan ini nantinya akan



memberikan respons atau tidak, di sisi lain kemoterapi juga mempunyai efek samping yang cukup besar dan banyak dikeluhkan penderita.

Saat ini prediksi respons kemoterapi didasarkan pada prediktor klinis stadium TNM (tumor, kelenjar getah bening, metastasis), hasil histopatologis (grading, jenis histopatologis, *lymphovascular invasion*) dan prediktor imunohistokimia (IHK). Pemeriksaan IHK berupa ER, PR, HER2, Ki67 sudah menjadi standar, selain itu juga banyak dilakukan penelitian prediktor IHK lain yang diusahakan untuk mencari prediktor respons kemoterapi meskipun masih meninggalkan masalah yaitu belum bisa secara tepat memprediksi respons kemoterapi. Masih banyak kasus resistensi yang belum bisa terjawab, sehingga kemudian muncul penelitian-penelitian lain untuk menilai respons kemoterapi neoajuvan. Kemoterapi juga mempunyai banyak efek samping dan dapat menyebabkan deviasi fenotif, sehingga penggunaan kemoterapi harus benar-benar selektif, untuk itu dibutuhkan adanya prediktor protein lain yang lebih baik untuk mengukur respons kemoterapi agar risiko resistensi dan rekurensi dapat ditekan.

Sel-sel pada kanker payudara merupakan fenotif sel epitel yang sel-selnya terintegrasi antara sel satu dengan yang lain, kemudian akan mengalami perubahan menjadi sel mesenkimal melalui aktivasi EMT (*epithelial to mesenchymal transition*). Aktivasi EMT ini akan mengubah karakter sel epitelial kanker payudara menjadi sel mesenkimal yang sel-selnya terlepas satu dengan yang lain sehingga bersifat lebih motil dan mobil (Ellen *et al.*, 2010). Sel mesenkim ini mempunyai kemampuan untuk bermigrasi menembus sistem sirkulasi, kemudian menginvasi jaringan sekunder lain dan tumbuh menjadi tumor baru (Lee *et al.*, 2011). EMT pada kanker payudara diperkirakan banyak terjadi pada stadium lanjut lokal di antaranya adalah stadium IIIB, dimana pada stadium lanjut lokal inilah terjadi progresifitas, mobilisasi sel dan metastasis sel kanker payudara, yang dimulai dari mekanisme EMT. Mekanisme inilah yang diduga menjadi salah satu sebab mengapa kemoterapi menjadi resisten dan gagal memberikan respons.

Beberapa protein yang terekspresi terkait dengan aktifitas EMT telah diidentifikasi pada penelitian sebelumnya, dimana dalam proses aktivasi EMT terdapat perubahan ekspresi protein-protein epitelial dan mesenkimial sebagai marker progresifitas sel kanker. E-cadherin merupakan protein marker fenotipe sel epitel, sedangkan Vimentin merupakan protein marker fenotipe sel mesenkimial, kedua protein ini bisa diamati dan diukur dengan pemeriksaan imunohistokimia jaringan kanker payudara dari hasil biopsi atau operasi (Lee *et al.*, 2011). Penurunan ekspresi E-cadherin banyak dikaitkan dengan peningkatan progresifitas tumor, terjadinya metastasis dan tingginya resistensi, sedangkan peningkatan ekspresi Vimentin dilaporkan berhubungan dengan peningkatan pertumbuhan tumor, tingkat invasi, prognosis yang buruk dan respons kemoterapi yang buruk pada berbagai jenis kanker epitelial termasuk kanker payudara (Li *et al.*, 201), sehingga diperkirakan kemungkinan ekspresi Vimentin yang rendah dan ekspresi E-cadherin yang tinggi berhubungan dengan gagalnya respons kemoterapi.

Selain peningkatan ekspresi Vimentin dan penurunan E-cadherin, disebutkan bahwa populasi CD44 yang tinggi dan CD24 yang rendah merupakan karakteristik dari EMT. CD44 merupakan protein transmembran yang ekspresinya meningkat selama kondisi hipoksia di lingkungan mikro dan dikaitkan dengan agresifitas sel kanker (Ghuwalewala *et al.*, 2016), karakter sel yang mengekspresikan CD44 menunjukkan perilaku sel yang lambat membelah, dan mempunyai tingkat resistensi yang tinggi terhadap kemoterapi (Genevieve *et al.*, 2011). Protein CD24 merupakan protein yang terekspresi pada berbagai sel yang sedang berkembang dan pada berbagai jenis keganasan, CD24 dapat meningkatkan potensi metastatik pada sel kanker. Beberapa studi menyebutkan bahwa CD24 merupakan marker penting untuk menilai prognosis survival rate kanker paru. Ekspresi CD44 yang tinggi dan CD24 yang rendah berhubungan dengan resistensi kemoterapi, ini dikaitkan dengan kemampuan sel dengan karakter tersebut mampu memompa keluar obat yang masuk kedalam sel dengan bantuan glikoprotein P (Wei *et al.*, 2012), sehingga diduga ekspresi CD44 yang rendah dan ekspresi CD24 yang tinggi berhubungan dengan respons kemoterapi.



Sejauh ini belum ada prediktor biomolekular yang tepat untuk memperkirakan respons kemoterapi, oleh karena itu sangat penting untuk menemukan prediktor baru untuk menilai respons kemoterapi yang lebih tepat dan akurat. Berdasarkan teori interaksi antar protein (protein protein interaction) disebutkan bahwa antar protein dengan protein lain terdapat interaksi khususnya di dalam sinyal transduksi (Archakov *et al.*, 2003), sehingga dapat diduga bahwa keempat protein Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 secara bersama-sama dapat memprediksi lebih tepat dibanding sendiri-sendiri. Namun sejauh ini belum diketahui apakah keempat biomarker tersebut secara bersama dapat digunakan sebagai prediktor keberhasilan kemoterapi lebih tepat dibanding sendiri-sendiri. Dengan demikian diperlukan penelitian untuk membuktikan bahwa biomarker Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 menunjukkan respons kemoterapi baik secara tersendiri ataupun secara bersama. Untuk membuktikan biomarker mana yang lebih tepat sebagai prediktor perlu dibuat suatu model prediktor. Penelitian ini dilakukan pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal yang dirawat di RSUD dr. saiful Anwar Malang.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi Vimentin yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal?
2. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi E-cadherin yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal?
3. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi CD44 yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal?



4. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi CD24 yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?
5. Apakah kombinasi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat digunakan sebagai satu model prediktor respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat dijadikan sebagai model prediktor respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Membuktikan hubungan antara ekspresi Vimentin yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?
2. Membuktikan hubungan antara ekspresi E-cadherin yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?
3. Membuktikan hubungan antara ekspresi CD44 yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?
4. Membuktikan hubungan antara ekspresi CD24 yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?



5. Membuktikan bahwa kombinasi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat digunakan sebagai satu model prediktor respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal?

1.4. Manfaat

1.4.1. Manfaat klinis

Manfaat bagi perkembangan terapi kanker payudara, terobosan baru aplikasi biomolekuler ini dapat dipakai sebagai prediktor progresifitas sel kanker payudara, sehingga didapatkan indikator kemoterapi neoajuan yang lebih tepat untuk diberikan, dilanjutkan atau dihentikan pada pasien kanker payudara, sehingga dapat memberikan hasil kemoterapi yang lebih efektif.

1.4.2. Manfaat teoretis

Manfaat dari penelitian ini untuk pengembangan konsep prediktor progresifitas dan respons kemoterapi pada kanker payudara secara biomolekuler. Konsep prediktor yang dikembangkan adalah kombinasi dari Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 untuk memprediksi progresifitas dan respons kemoterapi pada kanker payudara stadium IIIB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Progresifitas kanker payudara

Progresifitas kanker didefinisikan sebagai suatu fase yang ditandai dengan adanya pertumbuhan sel kanker yang cepat dan mempunyai kemampuan invasi yang tinggi, sehingga memungkinkan perilaku tumor yang lebih agresif dan berpotensi besar untuk metastasis. Kanker payudara merupakan keganasan yang paling sering terjadi pada perempuan seluruh dunia. Berdasarkan data analisis retrospektif *World Health Organization* (WHO), kanker payudara menyumbang 23% dari seluruh kasus kanker dan menempati posisi kedua sebagai penyebab kematian yang memiliki angka mortalitas 14% (Autier *et al.*, 2010).

Menurut Amerika Cancer Society (ACS), pasien kanker payudara punya peluang sebesar 22 persen untuk tetap hidup selama lima tahun setelah diagnosis stadium lanjut jauh (stadium IV). Persentase ini jauh lebih rendah daripada kanker payudara stadium yang lebih awal, pada kanker payudara stadium III, tingkat kelangsungan hidup lima tahun adalah 72 %, sedangkan pada stadium 2 adalah 90%. Karena tingkat kelangsungan hidup pasien kanker stadium III cukup besar, maka perhatian pemberian kemoterapi neoajuvan yang tepat dan benar menjadi sangat penting untuk diperhatikan dan dicarikan jawaban melalui penelitian untuk menganalisis prediktor respons yang bisa digunakan sebagai pedoman pemberian kemoterapi.

Secara fisiologis tiap sel akan berespons terhadap perubahan lingkungan melalui sinyal eksternal yang disebut dengan *growth factor*. *Growth factor* tersebut akan berinteraksi dengan reseptor permukaan sel, kemudian menginduksi serangkaian aktifitas sinyal internal yang berlanjut pada level DNA, melalui faktor transkripsi yang berikatan dengan bagian promotor dari gen akan menstimulasi pembelahan sel, diferensiasi, proliferasi, migrasi sel dan serta aktifasi kematian sel yang terprogram atau yang umum disebut apoptosis. Selain



growth factor, protoonkogen mempengaruhi pertumbuhan sel normal melalui aktivasi gen yang berhubungan dengan pertumbuhan tumor secara terus menerus dengan produksi *growth factor* yang masif, dan kerusakan kaskade intraselular yang menstimulasi proliferasi (Dancey *et al.*, 2000).

Keterlibatan molekul proinflamasi endogen dan toksin eksogen akan mengubah gen yang akan menyebabkan kerusakan genom termasuk di antaranya adalah gen untuk supresi tumor seperti p53. Hal ini akan berpengaruh pada pertumbuhan sel yang tidak terkendali pada tahap awal progresi tumor. Paparan onkogen akan mengaktifasi jalur NFκB sehingga gen penyandi untuk pengeluaran sitokin proinflamasi menjadi aktif ini memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF, IL-1, IL-6 dan IL-8, termasuk molekul adesi yang meningkatkan agregasi leukosit pada area inflamasi melalui serangkaian proses selular dengan hasil akhir proliferasi sel ataupun apoptosis (Jacobs *et al.*, 2005).

Sitokin IL-6 yang dikeluarkan oleh makrofag juga berperan dalam aktivasi Janus kinase (JAK1) yang kemudian menyebabkan fosforilasi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), fosforilasi STAT3 mengakibatkan translokasi STAT3 ke nukleus dan menginisiasi gen transkripsional seperti HIF-1 yang berperan penting pada mekanisme angiogenesis jaringan tumor, dan TGF-β yang menunjang pertumbuhan sel tumor dan metastasis. Selain itu *transforming growth factor beta* (TGF-β) juga merupakan komponen yang berperan dalam regulasi *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) dan memelihara kelangsungan program EMT. Perlu dipahami bahwa pada dasarnya kemoterapi tidak selektif terhadap apoptosis sel kanker saja, dan hanya bisa memberikan efek apoptosis pada saat sel yang sedang dalam pembelahan cepat dan aktifitas ini justru akan meningkatkan aktifitas sel imun untuk melakukan perbaikan dengan cara meningkatkan pertumbuhan jaringan tumor atau dengan memicu suatu progresi tumor sekunder lainnya (Zhou *et al.*, 2015).

Alpha serine/threonine-protein kinase (AKT) mempunyai peran penting dalam progresifitas siklus sel melalui fosforilasi dan inhibisi *glucocogen synthase kinase 3* yang menyebabkan fosforilasi dan degradasi dari cyclin D. Aktifasi AKT mempunyai *downstream*



singaling dari protein mTOR kinase yang berfungsi penting pada pertumbuhan sel. Protein mTOR berperan sebagai sensor nutrisi untuk menunjang perubahan ukuran sel dan mempertahankan siklus sel saat kondisi tidak menguntungkan (*unhomeostasis*). Selain itu mTOR juga mempunyai fungsi induksi HIF-1 dan HIF-2 yang merupakan faktor transkripsi VEGF dan angiogenesis pada kondisi hipoksia. AKT juga bekerja dalam menunjang perubahan sel epitel menjadi sel mesenkim (*epithelial to mesenchymal transition/EMT*) yang akan menginduksi metastasis sel dan invasi sel melalui sekresi *matrix metalloproteinases/MMP* (Mitchel *et al.*, 2013).

2.2. Subtipe molekular kanker payudara

Saat ini klasifikasi kanker payudara didasarkan pada hasil analisis ekspresi gen, karena itu kanker payudara dibagi menjadi beberapa subtipe berdasarkan profil ekspresi gennya. *The St Gallen International Expert Consensus* pada tahun 2011 merilis sistem klasifikasi biomolekular kanker payudara yang bertujuan menjelaskan hubungan antara subtipe kanker payudara dan karakteristik genomik, klasifikasi ini berdasarkan ekspresi *estrogen receptor* (ER), *progesterone receptor* (PR), HER2 dan Ki-67. Sistem klasifikasi ini membagi kanker payudara invasif menjadi 4 subtipe yaitu Luminal A, Luminal B, HER2 dan *triple negative/basal like*.

Sebenarnya sistem klasifikasi biomolekular ini sudah dibahas dalam studi-studi sebelumnya dimana kanker payudara dibagi menjadi subtipe Luminal A bila ER(+), PR(+/-), HER2(-), Ki-67(low), subtipe Luminal B bila ER(+), PR(+/-), HER2(+/-), Ki-67(high); subtipe HER2-enriched bila ER(-), PR(-), HER2(+) dan terakhir subtipe *Basal-like* (subtipe *Triple Negative*) bila ER(-), PR(-), HER2(-) (Castellano *et al.*, 2013).

Klasifikasi berdasar subtipe molekular kanker payudara dibagi sebagaimana tabel di bawah ini.

Tabel 2.1 Subtipe molekular kanker payudara



Subtipe	Ekspresi gen	Prevalensi
Luminal A	ER+ dan/ PR+, HER2-, Ki67 <i>low</i>	40%
Luminal B	ER+ dan/ PR+, HER2+ or HER2-, Ki67 <i>high</i>	20%
<i>Triple negative/basal-like</i>	ER-, PR-, HER2-	15-20%
HER2 type	ER-, PR-, HER2+	10-15%

Sumber: Castellano *et al.* (2013)

Dari Tabel 2.1 didapatkan data bahwa subtipe Luminal A yang ditandai dengan ER(+) dan atau PR(+), HER2(-) dan Ki67 rendah, mencakup 40% dari keseluruhan kasus kanker payudara, kanker payudara subtipe ini memiliki laju proliferasi yang rendah, angka rekurensi 27,8%, metastasis 10-20%, dan *median survival* dari waktu rekurensi 2,2 tahun.

Jenis Luminal B mencakup 10-20% dari kasus kanker payudara dimana secara histokimia ditandai ER(+) dan atau PR(+), ekspresi HER2(+) dan Ki67(tinggi). Pasien kanker payudara subtipe ini memiliki laju proliferasi tinggi, angka rekurensi 30%, metastasis 14% dan *median survival* dari masa rekurensi 1,6 tahun (Castellano *et al.*, 2013).

Sebagian besar kanker payudara termasuk dalam kelompok subtipe Luminal. Sel tumor Luminal adalah sel tumor yang muncul dimulai dari sel kanker yang berada di dalam lumen (*inner cell* dari duktus laktiferus). Secara singkat subtipe Luminal, yaitu Luminal A dan Luminal B yang keduanya ditandai dengan imunohistokimia ER (estrogen reseptor) positif dan/ PR (progesteron reseptor) positif, mempunyai survival yang relatif lebih baik dari pada subtipe non-Luminal dan merupakan jumlah terbanyak dari keseluruhan subtipe kanker payudara. Karakteristik subtipe Luminal A dan Luminal B sangat berbeda dengan subtipe lainnya seperti subtipe *Triple Negative* dan subtipe *HER2-enriched*. Subtipe *Triple Negative* merupakan subtipe yang paling jelek prognosisnya, mempunyai ER (estrogen reseptor) negatif, PR (progesteron reseptor) negatif, HER2 negatif dan subtipe ini merupakan yang



paling sulit untuk diterapi. Sedangkan sub tipe HER2+ ditandai dengan ER(-), PR(-), HER2(+) juga mempunyai prognosis jelek, namun sesudah ditemukannya terapi *targetted monoclonal antibody* anti HER2 maka saat ini prognosinya lebih baik dari pada sub tipe *Triple Negative*. Sehingga kita bisa mengelompokkan sub tipe Luminal A dan Luminal B yang mempunyai karakteristik relatif hampir sama menjadi satu kelompok Luminal (Creighton *et al.*, 2012).

Dari sebuah penelitian dilakukan analisis untuk menilai hubungan antara kemoterapi neoajuan dengan respons klinis pada ketiga sub tipe kanker payudara. Analisis molekular ditentukan dengan profil imunohistokimia. Pasien diterapi dengan kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin yaitu doksorubisin ditambahkan dengan siklofosamid. Respons klinis terhadap rejimen ini lebih tinggi pada kelompok HER2(+)/ER(-) (70%) dan basal-like (85%) dibandingkan pada sub tipe Luminal (47%) ($p < 0,001$). Respons kompliit patologis ditunjukkan pada 36% kelompok HER2+/ER-, 27% kelompok basal-like, dan hanya 7% pada Luminal ($p = 0,01$). Walaupun begitu, pasien dengan basal-like dan HER2(+)/ER(-) tetap menunjukkan survival dan metastasis yang lebih buruk ($p = 0,02$). Prognosis relaps juga ditunjukkan lebih buruk secara signifikan ($p = 0,003$) (Carey *et al.*, 2007).

Ekspresi protein estrogen reseptor (ER), progesteron reseptor (PR) dan HER2 ternyata akan mengalami perubahan setelah diberikan kemoterapi neoajuan, sehingga sub tipe kanker payudara dapat berubah setelah pemberian kemoterapi. Bahkan dari penelitian lain didapatkan adanya perubahan sebesar 100 persen sub tipe kanker payudara yang telah diberikan kemoterapi neoajuan, karena itu diperlukan pemeriksaan ulang ekspresi protein-protein ER, PR dan HER2 untuk membuat strategi pemberian kemoterapi lanjutan setelah pembedahan (*completion chemotherapy*) (Vallejos *et al.*, 2015).

2.3 Stadium kanker payudara

Pada umumnya progresi kanker solid dapat diukur berdasarkan perubahan diameter tumor (Benson, 2010). Beberapa model yang digunakan untuk pengukuran progresi tumor salah satunya adalah berdasarkan stadium TNM. *The Union for International Control* (UICC) dan *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) keduanya menggunakan sistem klasifikasi TNM untuk menggambarkan stadium tumor. Sistem TNM berdasarkan *American Joint Committee on Cancer Staging*, (2017):

Tumor Primer (T)

TX : Tumor primer tidak dapat dievaluasi

T0 : Tidak didapatkan tumor primer

Tis : *Carcinoma insitu*

Tis : DCIS

Tis : LCIS

Tis (Paget): *Paget disease* pada papila tidak berhubungan dengan *invasive carcinoma* dan/atau *carcinoma insitu* (DCIS dan/LCIS)

T1 : Tumor ≤ 20 mm (diameter terbesar)

T1 mi: Tumor ≤ 1 mm (diameter terbesar)

T1a : Tumor > 1 mm, ≤ 5 mm (diameter terbesar)

T1b : Tumor > 5 mm, ≤ 10 mm (diameter terbesar)

T1c : Tumor > 10 mm, ≤ 20 mm (diameter terbesar)

T2 : Tumor > 20 mm, ≤ 50 mm (diameter terbesar)

T3 : Tumor > 50 mm (diameter terbesar)

T4 : Tumor ukuran berapa pun, dengan ekstensi pada dinding dada dan/atau kulit (ulkus atau *satellite nodule*)

T4a : Ekstensi ke dinding dada, tidak termasuk muskulus pectoralis

T4b : Ulkus dan atau ipsilateral *satellite nodule* dan atau edema (*peau d'orange*) kulit, tidak termasuk *inflammatory carcinoma*

T4c : T4a dan T4b

T4d : *Inflammatory carcinoma*



Kelenjar getah bening regional (N)

Nx : Kelenjar getah bening (KGB) tidak bisa dievaluasi (misal pasca operasi eksisi/deseksi aksila)

N0 : Tidak ada metastasis ke KGB

N1 : Metastasis pada KGB ipsilateral level I, II yang bisa digerakkan

N2 : Metastasis pada KGB ipsilateral level I, II yang tidak bisa digerakkan, fixed dengan jaringan sekitarnya atau melekat satu sama lain; atau secara klinis didapat KGB mamaria interna tanpa perlu adanya bukti metastasis pada KGB aksila

N2a : Metastasis pada KGB ipsilateral level I, II yang tidak bisa digerakkan dengan jaringan sekitarnya atau melekat satu sama lain

N2b : Metastasis pada KGB mamaria interna tanpa perlu adanya bukti metastasis pada KGB aksila

N3 : Metastasis pada KGB ipsilateral infraklavikula (level III aksila) dengan atau tanpa pembesaran KGB aksila level I, II atau secara klinis terdeteksi pembesaran KGB mamaria interna dengan disertai pembesaran KGB aksila level I, II atau metastasis KGB supraklavikula ipsilateral

Pathologis (pN)

pNx : KGB regional tidak dapat dievaluasi (misalnya karena sudah dilakukan operasi sebelumnya dan tidak dilakukan pemeriksaan patologi)

pN0 : Tidak ada metastasis KGB yang didapat pada pemeriksaan histopatologi

pN0(i-): Tidak ada metastasis KGB secara histopatologi/IHC negatif

pN0(i+): Metastasi KGB \leq 0,2 mm (terdeteksi dengan H&E atau IHC termasuk ITC)

pN0(mol-): Tidak ada metastasis KGB secara histopatologi, *negative molecular findings* (RT-PCR)

pN0(mol+): *Positive molecular findings* (RT-PCR), tapi tidak ada metastasis KGB secara histopatologi/IHC

pN1 : Mikrometastasis, atau metastasis pada 1 - 3 KGB; dan atau metastasis KGB mamaria interna yang terdeteksi dengan SLNB tapi tidak terdeteksi secara klinis



pN1mi : Mikrometastasis ($>0,2$ mm dan/ >200 sel, tapi tidak $>2,0$ mm)

pN1a : Metastasis pada 1-3 KGB aksila, minimal 1 metastasis $>2,0$ mm

pN1b : Metastasis pada KGB mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis yang terdeteksi dengan SLNB tapi tidak terdeteksi secara klinis

pN1c : Metastasis pada 1-3 KGB aksila dan KGB mamaria interna atau makrometastasis yang terdeteksi dengan SLNB tapi tidak terdeteksi secara klinis

pN2 : Metastasis pada 4-9 KGB aksila, atau secara klinis terdeteksi KGB mamaria interna tanpa metastasis KGB aksila

pN2a : Metastasis pada 4-9 KGB aksila (minimal 1 KGB metastasis ukuran $>2,0$ mm)

pN2b : Metastasis secara klinis pada KGB mamaria interna tanpa metastasis KGB aksila

pN3 : Metastasis pada 10 KGB aksila; atau pada KGB infraklavikular (KGB aksila level 3); atau metastasis pada KGB mamaria interna disertai dengan pembesaran 1 KGB aksila level I, II, atau metastasis pada >3 KGB aksila dan pada mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis yang terdeteksi dari SLNB tapi secara klinis tidak terdeteksi; atau metastasis pada KGB supraklavikular

pN3a : Metastasis pada 10 KGB aksila (minimal deposit tumor > 2 mm); atau metastasis pada KGB infraklavikular (KGB aksila level 3)

pN3b : Metastasis pada KGB mamaria interna ipsilateral dengan disertai metastasis pada 1 KGB aksila; atau metastasis pada 3 KGB aksila dan KGB mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis yang terdeteksi dari SLNB tapi secara klinis tidak terdeteksi

pN3c : Metastasis pada KGB supraklavikula ipsilateral

Metastasis jauh (M)

M0 : Tidak didapatkan metastasis secara klinis maupun radiologis

cM0(i+): Tidak didapatkan metastasis secara klinis maupun radiologis, tapi didapatkan deposit molekular atau secara mikroskopis didapatkan sel tumor di dalam sirkulasi darah, sumsum tulang, atau kelenjar getah bening regional lain $>0,2$ mm pada pasien tanpa tanda dan gejala metastasis



M1 :Didapatkan metastasis jauh secara klinis atau radiologis dan atau didapatkan metastasis jauh secara histopatologis $\leq 0,2$ mm

Dari stadium TNM klinis yang sudah dipaparkan di atas kemudian dapat disimpulkan di dalam pengelompokan stadium yang disebut *grouping stadium*, seperti pada tabel di bawah ini.

Tabel 2.2. Grouping staging

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I A	T1	N0	M0
Stadium I B	T0 T1	N1mi	M0
Stadium II A	T0 T1	N1	M0
Stadium II B	T2 T3	N0 N1	M0
Stadium III A	T0 T1 T2 T3	N2 N2 N2 N1 N2	M0
Stadium III B	T4 T4 T4	N0 N1 N2	M0
Stadium III C	Semua T	N3	M0
Stadium IV	Semua T	Semua N	M1

Sumber: *The Union for international control (UICC)* dan *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (2017)

Secara klinis klasifikasi kanker payudara berdasarkan sistem TNM dapat disimpulkan dalam 4 kategori antara lain:



- a. Stadium 0 (stadium *insitu*) yaitu dimana sel kanker masih terbatas di dalam sel-sel duktus dan lobulus, tumor tidak teraba secara klinis, ada 3 jenis karsinoma insitu yaitu DCIS (*ductal carcinoma insitu*) dan LCIS (*lobular carcinoma insitu*), dan *Paget's disease*.
- b. Stadium dini/*early stadium breast cancer* (stadium I dan II) yaitu kanker yang terlokalisir pada tumor primer, tidak menyebar pada jaringan sekitar di payudara atau kelenjar limfe di aksila pada kedua sisi tubuh dan tidak ada penyebaran pada organ tubuh yang lain.
- c. Stadium lanjut lokal/*locally advanced breast cancer* (stadium IIIA, IIIB, IIIC) yaitu bila ukuran lebih dari 5 cm, terdapat infiltrasi tumor ke kulit atau otot pada dada, dan adanya penyebaran pada kelenjar limfe. Stadium yang dipilih dalam penelitian ini adalah stadium IIIB saja, yaitu tumor berukuran > 5 cm, terdapat infiltrasi sel kanker pada kulit antara lain ulkus, nodul satelit dan *peau d'orange* (kulit payudara seperti kulit jeruk).
- d. Stadium metastasis jauh/*metastatic breast cancer* (stadium IV) yaitu kanker sudah metastasis dengan penyebaran sel kanker ke organ jauh seperti paru, hati, tulang, dan lain-lain (Benson, 2010).

2.4. Kemoterapi dan respons kemoterapi

Pada dasarnya terapi kanker payudara tergantung dari stadiumnya. Stadium dini, yaitu stadium I dan II, terapinya adalah pembedahan. Untuk stadium lanjut lokal atau stadium III, terapinya adalah kemoterapi neoajuvan. Sedangkan stadium IV atau metastasis, terapinya adalah kemoterapi primer sebagai terapi paliatif. Kemoterapi adalah pemberian obat anti kanker (sitostatika) yang bertujuan untuk membunuh sel kanker, adapun indikasi kemoterapi adalah:

- a. Kemoterapi neoajuvan, yaitu kemoterapi yang diberikan sebelum terapi primer seperti pembedahan pada kanker payudara stadium lanjut lokal.
- b. Kemoterapi ajuvan, yaitu kemoterapi yang diberikan sesudah terapi primer seperti pembedahan pada kanker payudara stadium dini.



- c. Kemoterapi paliatif, yaitu kemoterapi sebagai terapi primer pada kanker stadium lanjut jauh/metastasis jauh.
- d. Kemoterapi sensitisaier, yaitu kemoterapi yang diberikan bersama-sama dengan radioterapi untuk memperkuat efek radioterapi (Nowak *et al.*, 2003).

Kemoterapi neoajuvan adalah kemoterapi yang diberikan sebelum terapi primer yaitu pembedahan. Kemoterapi jenis ini merupakan terapi standar pada kanker payudara stadium lanjut lokal (stadium III). Kemoterapi neoajuvan bertujuan untuk mengecilkan ukuran tumor pada stadium lanjut lokal yang *unresectable* (sulit untuk dioperasi), sehingga diharapkan setelah kemoterapi neoajuvan tumor primer akan mengecil, lebih mudah dioperasi, batas operasi lebih jelas dan bisa didapatkan hasil operasi yang bebas tumor (*free margin*) secara histopatologis. Kemoterapi neoajuvan selain bertujuan untuk mengecilkan ukuran tumor sebelum operasi, juga bertujuan untuk mematikan dan menekan sel-sel mikrometastasis sehingga mengurangi risiko metastasis ke organ jauh. Keuntungan lain dari pemberian kemoterapi neoajuvan adalah bisa dilihat langsung respons kemoterapi secara *invivo* pada tubuh pasien, sehingga dengan melihat respons kemoterapi sebelum operasi kita bisa menentukan apakah kemoterapi lanjutan (*completion adjuvant chemotherapy*) kita berikan atau kita ganti dengan rejimen kemoterapi jenis lainnya (Kokher *et al.*, 2011).

2.4.1. Kemoterapi berbasis antrasiklin

Kemoterapi berbasis antrasiklin adalah kombinasi: CAF, dosis Cyclophosphamide 500 mg/m², Adriamisin/Doksorubisin 50 mg/m², 5-Fluoro Urasil 500 mg/m², yang diberikan dengan interval 3 minggu. Kombinasi yang lain adalah CEF, dosis Epirubisin 70 mg/m², diberikan interval 3 minggu (Manuaba IBT, 2010). Kemoterapi berbasis antrasiklin termasuk rejimen yang sering dipakai, terutama adriamisin/doksorubisin, baik neoajuvan maupun ajuvan. Pada bulan Januari sampai Desember 2015 di poliklinik bedah Onkologi RSUD Dr. Saiful Anwar Malang pemakaian kemoterapi CAF mencapai 62% dari total

kemoterapi baru 434 pasien. Sementara pemakaian CEF 3%, CMF 6%, dan kombinasi yang lain 29%.

Kemoterapi berbasis doksorubisin merupakan salah satu kombinasi pemberian kemoterapi neoajuvan dan ajuvan yang bekerja mencegah sintesis DNA dan perbaikan DNA melalui penghalangan enzim topoisomerase yang ditemukan pada tahun 1957, sampai saat ini tetap merupakan salah satu obat antikanker yang paling luas digunakan pada kanker payudara. Cara kerjanya melalui mekanisme transpor urasil terfasilitasi dan kemudian dianabolisme menjadi berbagai bentuk nukleotida sitotoksik lewat beberapa jalur biokimiawi. Diperkirakan prosesnya antara lain inhibisi (menyebabkan deplesi deoksitimidin trifosfat yang mengganggu biosintesis dan reparasi DNA), inkorporasi RNA (menyebabkan perubahan dalam pemrosesan RNA dan/atau translasi mRNA) dan inkorporasi DNA (menyebabkan penghambatan sintesa dan fungsi DNA). Stres genotoksik yang disebabkan penghambatan pada enzim topoisomerase dapat mengaktifasi jalur-jalur apoptosis pada sel-sel rentan yang menyebabkan fragmentasi DNA induk (Wu *et al.*, 2011).

Sedangkan epirubisin merupakan obat kemoterapi golongan antrasiklin yang bersifat antineoplastik, kemoterapi golongan ini mampu memicu apoptosis melalui aktivasi p53 lewat jalur reseptor kematian dan jalur mitokondria yang merupakan jalur intrinsik apoptosis. Epirubisin memicu sinyal kematian sel melalui overekspresi p53, kemudian mengaktifasi protein proapoptotik seperti Bax. P53 berperan penting dalam mengatur apoptosis sel melalui regulasi protein proapoptotik (Bax) dan regulasi negatif protein Bcl-2. P53 menyebabkan siklus sel istirahat pada fase G1 dan G2/M yang biasanya diatur oleh gen p21. Kondisi ini juga meningkatkan kemampuan sel untuk melakukan repair DNA dengan demikian menghambat sel menuju fase mitosis di G2. Jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, produksi ROS oleh epirubisin dapat meningkatkan rasio banding Bax/Bcl-2. Keadaan ini menghasilkan perubahan penting pada terbukanya permeabilitas mitokondria (*mitochondrial permeability transition pore*), mengganggu potensial membran mitokondria, mengaktifasi caspase 9 dan memicu terjadinya apoptosis (Buchholz *et al.*, 2003).



2.4.2. Respons kemoterapi

Pada umumnya progresifitas kanker solid dapat diukur berdasarkan perubahan diameter tumor. Penilaian respons obyektif pemberian kemoterapi terhadap kanker payudara terdiri dari ukuran tumor, marker prediktor, dan perubahan subyektif yaitu perubahan gejala klinis, misal rasa nyeri yang mengganggu. Penilaian respons kemoterapi terhadap perubahan tumor diukur berdasarkan standar RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) yaitu mengukur perubahan ukuran tumor sebelum dan sesudah kemoterapi neoajuan, dimana tumor diukur dari diameter terbesarnya. Kriteria respons kemoterapi terhadap tumor adalah sebagai berikut:

1. Respons komplit/*Complete Response* (CR): tumor menghilang.
2. Respons parsial/*Partial Response* (PR): tumor mengecil 30%.
3. *Stable Disease* (SD): tumor mengecil tapi < 30% atau membesar tapi < 20%
4. *Progressive Disease* (PD): tumor membesar 20% atau tumbuh tumor baru di tempat lain (Bogaerts *et al.*, 2009)

Selanjutnya respons komplit dan respons parsial dimasukkan dalam kelompok 'respons', sedangkan *stable disease* dan *progressive disease* dimasukkan dalam kelompok 'tidak respons'. Selama masa pemberian kemoterapi neoajuan, setiap akan diberikan kemoterapi dilakukan pengukuran tumor primernya, dan sesudah pemberian siklus ke 3 atau ke 4 dilakukan penilaian ulang ukuran tumor untuk menilai respons terapi dan operabilitasnya. Bila didapatkan respons (respons komplit atau respons parsial), dan tumor menjadi *operable*, maka dilanjutkan dengan operasi *modified radical mastectomy* sebagai terapi definitif, kemudian selanjutnya akan diberikan kemoterapi lanjutan 3 siklus lagi setelah operasi. Setelah penilaian respons kemoterapi yang didasarkan pada respons klinis yaitu perubahan ukuran sesuai standar RECIST.



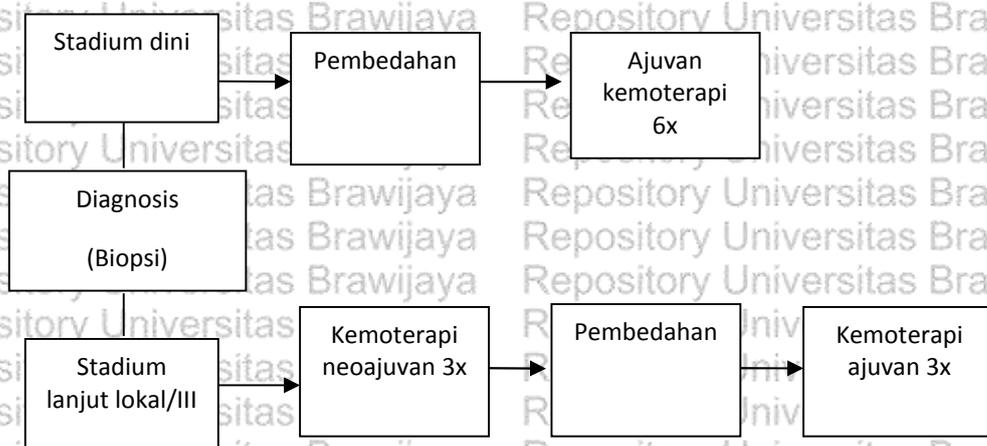
Setiap pasien sebelum diberikan kemoterapi neoajuan terlebih dulu dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi protein ER, PR, HER2 dan Ki67 (subtipe kanker payudara) dari jaringan biopsi kanker payudara. Diketahui bahwa ekspresi prediktor biomolekuler tersebut banyak mengalami perubahan deviasi ekspresi pasca pemberian kemoterapi neoajuan. Selain itu juga ternyata dari berbagai penelitian tentang ekspresi protein-protein tersebut dan kriteria subtipe kanker payudara masih meninggalkan banyak pertanyaan yang belum terjawab terhadap respons kemoterapi yang belum memuaskan. Di sisi lain respons perubahan ukuran secara klinis belum tentu sama dan linier dengan perubahan biomolekuler dalam kanker payudara, sehingga penelitian marker biomolekuler baru untuk memprediksi respons kemoterapi yang lebih obyektif dan lebih baik menjadi sangat penting untuk dilakukan.

Penelitian terhadap 174 orang pasien kanker payudara stadium III yang diberikan kemoterapi neoajuan antara tahun 1974 dan 1985, semua pasien diberikan kemoterapi antrasiklin yaitu kombinasi 5-fluorourasil, adriamisin (doxorubisin), dan siklofosamid (FAC). Setelah pasien mendapatkan kemoterapi neoajuan 3 siklus, semua pasien dilakukan operasi mastektomi dan radioterapi eksterna, setelah itu pasien-pasien diberikan kemoterapi ajuvan lanjutan 3 siklus tambahan lagi. Didapatkan sebanyak 48 pasien stadium IIIA dan 26 pasien dengan stadium IIIB. Sebanyak 16,7% pasien mengalami respons komplit dan 70,7% pasien mengalami respons parsial setelah pemberian kemoterapi neoajuan FAC. Respons komplit lebih tinggi terjadi pada pasien-pasien stadium IIIA dibanding IIIB. Median follow-up grup pasien ini dilakukan selama 59 bulan. Ternyata *5-year disease-free survival rates* sebesar 84% pada pasien dengan stadium IIIA, dan 33% pada pasien stadium IIIB. Sedangkan *5-year survival rate* untuk pasien-pasien stadium IIIA 84%, dan untuk stadium IIIB 44%. Setelah 10 tahun, 56% pasien-pasien stadium IIIA dan 26% pasien stadium IIIB tetap hidup *survive*. Lima belas pasien (15,3%) mengalami rekurensi (kekambuhan) regional. Modifikasi dan strategi terapi yang lebih baik kemungkinan bisa meningkatkan *survival rates* penderita kanker payudara stadium III (Gabriel *et al.*, 1988). Kalau melihat

kesintasan penderita kanker payudara stadium IIIB yang *5-year survival rate (5-YSR)*nya masih hanya sekitar 44%, maka tentu penelitian untuk menemukan prediktor yang lebih tepat menjadi sangat penting.

2.4.3. Prosedur kemoterapi pada kanker payudara

Pada prosedur penatalaksanaan kanker payudara, rejimen kemoterapi dipilih berdasarkan hasil penegakan diagnosis histopatologi melalui prosedur biopsi jaringan tumor payudara seperti pada bagan di bawah ini.



Gambar 2.1. Kemoterapi ajukan dan neoajukan

Gambar 2.1 menjelaskan bahwa kemoterapi ajukan diberikan untuk kanker payudara stadium dini yang telah dilakukan pembedahan untuk membunuh sel-sel mikrometastasis untuk mengurangi risiko kekambuhan dan metastasis. Sedangkan kemoterapi neoajukan diberikan sebelum dilakukan pembedahan untuk pasien kanker payudara stadium lanjut lokal, yang mana tujuan kemoterapi disini untuk mengubah ukuran tumor yang besar dan sulit untuk dilakukan operasi, diharapkan setelah kemoterapi tumor akan mengecil dan lebih mudah untuk dilakukan pembedahan, sehingga pembedahan menjadi lebih sederhana dan juga untuk mematikan sel-sel mikrometastasis (Fisher *et al.*, 1997).

Penggunaan rejimen kemoterapi kombinasi lebih efektif dibandingkan dengan penggunaan rejimen tunggal, hal ini dikaitkan dengan fakta bahwa paparan beberapa agen



sitotoksik dengan mekanisme kerja yang berbeda namun sinergis dan tidak menyebabkan toksisitas kumulatif yang lebih besar akan memberikan efikasi terapi lebih besar, serta akan meminimalisir resistensi terhadap salah satu jenis kemoterapi. Pemilihan rejimen kombinasi kemoterapi didasarkan pada stadium kanker payudara, status hormonal, ekspresi HER2, status kelenjar getah bening, sub tipe dan kondisi klinis pasien. Pemberian rejimen kombinasi kemoterapi memungkinkan zat kemoterapi yang berbeda akan bekerja bersama-sama secara sinergis pada berbagai kondisi kanker payudara atau akan bekerja dimana pun ketika sel kanker akan menghindari secara imunologis, serta tanpa terjadi *overlapping* efek samping (Cleator *et al.*, 2002).

Dari berbagai jenis kombinasi kemoterapi untuk kanker payudara, salah satu rejimen yang banyak dipakai dan menjadi standar yang direkomendasikan oleh berbagai *guideline* di seluruh dunia antara lain oleh *National Comprehensive Cancer Guideline* (NCCN) dari Amerika Serikat, *European Society For Medical Oncology* (ESMO) dan juga di Indonesia adalah rejimen kombinasi berbasis antrasiklin FAC (5-FU, doksorubisin/epirubisin, siklofosfamid) seperti yang digunakan dalam penelitian ini.

2.4.4. Resistensi kemoterapi

Resistensi obat merupakan faktor utama yang membatasi efikasi kemoterapi. Tumor dapat secara intrinsik resisten sebelum pemberian kemoterapi, atau resistensi dapat juga diperoleh selama masa pengobatan kanker yang awalnya sensitif menjadi tidak sensitif terhadap kemoterapi. Selanjutnya akibat mekanisme *immunosuveillance* sel kanker dapat menjadi resisten terhadap berbagai agen kemoterapi, yang akhirnya menyebabkan kegagalan pengobatan pada lebih dari 90 % pasien kanker metastasis (Longley *et al.*, 2005).

Dari data satu penelitian dinilai hubungan antara respons kemoterapi neoajuan dengan hasil klinis pada tiga sub tipe kanker payudara. Analisis molekular ditentukan dengan profil imunohistokimia. Pasien diterapi dengan kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin, yaitu doksorubisin plus siklofosfamid. Respons klinis terhadap rejimen ini lebih tinggi pada



kelompok HER2+/ER- (70%) dan basal-like (85%) dibandingkan pada subtype Luminal (47%) ($p < 0,001$). Respons komplisit patologis ditunjukkan pada 36% kelompok HER2+/ER-, 27% kelompok basal-like, dan hanya 7% pada Luminal ($p = 0,01$). Walaupun begitu, pasien dengan basal-like dan HER2+/ER- tetap menunjukkan survival dan metastasis yang lebih buruk ($p = 0,02$), juga risiko rekurensi lebih besar secara signifikan ($p = 0,003$) (Carrey *et al.*, 2006)

Resistensi kemoterapi dapat timbul melalui sejumlah mekanisme yang berbeda, termasuk perubahan dalam farmakokinetik obat dan metabolisme, juga modifikasi ekspresi sasaran obat atau fungsi amplifikasi gen. Kelainan isotipe β -tubulin, dan mutasi topoisomerase II, pembatasan obat dalam organel sel, perbaikan kerusakan DNA akibat obat, perubahan jalur sinyal apoptosis seperti mutasi p53, dan ekspresi protein lain yang secara langsung mempengaruhi transportasi obat seluler. Karena itu mekanisme resistensi kemoterapi pada kanker payudara secara umum dapat dijelaskan oleh sebab gangguan transportasi, modifikasi zat aktif obat, perbaikan DNA, apoptosis dan inaktivasi obat. Mekanisme resistensi kemoterapi pada kanker payudara secara umum dapat dijelaskan sebagai mutasi pada:

- a. Transportasi: antrasiklin, taksan, alkaloid vinka, epipodofilotoksin, antifolat
- b. Modifikasi target obat: paklitaksel
- c. Perbaikan DNA: epirubisin, doksorubisin, metosantron
- d. Apoptosis: antrasiklin, siklofosamid
- e. Inaktivasi obat: siklofosamid (Kratz *et al.*, 2007)

Eksresi pompa seperti P-gp atau MRP1 memberikan kemampuan bagi sel-sel tumor untuk menghindari obat kemoterapi. P-gp adalah glikoprotein 170 kDa yang dikode oleh gen MDR1. Membran transporter yang bergantung pada ATP ini berfungsi sebagai pompa berbagai kemoterapi untuk melintasi membran sel dan keluar dari sel, termasuk antrasiklin, taksan, alkaloid vinca, epipodofilotoksin dan antifolate. Peran fisiologis P-gp yang normal masih belum diketahui, tetapi mungkin berfungsi melindungi jaringan normal dari produk-produk beracun dan xenobiotik. Ekspresi P-gp bervariasi pada kanker payudara,



sesuai dengan metode pengujian yang digunakan. Sebuah penelitian metaanalisis menunjukkan bahwa protein ini diekspresikan dalam sekitar 40% dari semua karsinoma payudara, meskipun penelitian lain melaporkan nilai setinggi 66%. Peningkatan ekspresi P-gp ini dikaitkan dengan tiga kali lipat peningkatan risiko kegagalan respons kemoterapi. Paparan kemoterapi dapat meningkatkan ekspresi P-gp pada kanker payudara, seperti yang terlihat pada beberapa pasien setelah kemoterapi neoajuan. Dalam satu metaanalisis, kemoterapi sebelumnya atau terapi hormonal ditemukan untuk meningkatkan frekuensi tumor dengan P-gp-positif hampir 1,8 kali lipat (Longley *et al.*, 2005).

Pada penelitian lain dengan RT-PCR, MRP1 ditemukan hampir pada semua kanker payudara. MRP1 bertanggung jawab atas resistensi terhadap agen seperti alkaloid vinka, antrasiklin, dan dosis tinggi metotreksat, tetapi tidak untuk paklitaksel atau mitoksantrone. Beberapa studi menunjukkan bahwa ekspresi MRP1 berkorelasi dengan buruknya kelangsungan hidup pasien dengan kanker payudara stadium dini yang mendapatkan kemoterapi, meskipun hubungan kausalnya belum jelas (Cizmarikova, 2010).

2.5 Faktor prognostik dan faktor prediktif kanker payudara

Berbagai modalitas terapi kanker payudara menunjukkan peningkatan kualitas dalam beberapa dekade terakhir baik dengan teknik operasi, terapi hormonal, radioterapi, kemoterapi kombinasi maupun *targetted therapy*. Kemoterapi merupakan salah satu modalitas yang sangat penting dimana terapi ini dapat berfungsi sebagai neoajuan, ajuan maupun terapi paliatif. Diantara semua fungsi tersebut, kemoterapi neoajuan yang paling berkembang, karena kemoterapi ini dapat menilai secara *in vivo* langsung tumor pada tubuh pasien sebelum dilakukan pembedahan. Kemoterapi neoajuan menjadi pilihan utama pada pasien *Local Advanced Breast Cancer* (LABC) atau stadium lanjut lokal, antara lain stadium IIIB, karena dapat menurunkan ukuran tumor dan mematikan sel kanker mikrometastasis (Schwartz *et al.*, 2004).

Kemoterapi neoajuan terus berkembang sebagai pengobatan kanker payudara terutama untuk pengecilan ukuran (*downsizing*) kanker payudara sehingga dapat dilakukan operasi. Selain itu, kemoterapi juga dapat membunuh sel-sel mikrometastasis yang



menyebabkan pertumbuhan tumor dan meningkatkan hasil klinis sehingga tumor dapat dioperasi dengan bersih. Kemoterapi neoajuan pertama sekali diperkenalkan oleh Haagensen pada tahun 1970 dan menjadi perhatian khusus sesudah keberhasilan penelitian yang dilakukan oleh Fischer pada tahun 1998. Wanita yang menderita kanker payudara stadium lanjut lokal yang belum mengalami metastasis memiliki pilihan untuk mendapatkan kemoterapi neoajuan sebelum tindakan operasi definitif (Fisher *et al.*, 1997).

Satu penelitian multisenter menunjukkan bahwa 36% pasien yang menerima kemoterapi neoajuan dengan doksorubisin dan siklofosamid menunjukkan respons klinis yang komplit dan prognosis yang baik terutama terhadap *disease free survival* ($p=0,001$) (Fisher *et al.*, 1998). Pada studi EORTC, dilaporkan bahwa hampir 23% pasien yang sebelumnya tidak dapat dilakukan operasi *breast conserving surgery* menjadi dapat dilakukan operasi tersebut sesudah kemoterapi neoajuan. Namun, banyak juga ditemukan kasus kemoresistensi pada pasien yang diterapi dengan kemoterapi neoajuan, sehingga waktu dan efek samping kemoterapi menyebabkan kerugian untuk pasien tanpa didapatkan keuntungan sedikit pun (Cleator *et al.*, 2011). Oleh sebab itu, peneliti berasumsi bahwa perlu suatu prediktor yang lebih akurat lagi yang diharapkan ke depan dapat mengidentifikasi prediktor kanker payudara untuk menilai sensitifitas terhadap kemoterapi dan menghindari efek samping lebih berat apabila ternyata pasien tersebut kemoresisten.

Ada berbagai macam faktor prognostik dan prediktif dari respons modalitas terapi kanker payudara termasuk penilaian respons kemoterapi. Sebenarnya kedua jenis faktor prognostik dan prediktif ini hampir sama, hanya bahwa faktor prognostik adalah suatu faktor konstitusi pada tubuh pasien yang dapat memberikan informasi prospektif mengenai prognosis pasien secara umum, sedangkan faktor prediktif lebih kepada informasi terhadap prediksi hasil terapi. Beberapa protein penanda biomolekuler dapat bersifat prognostik maupun prediktif (Tonini *et al.*, 2008).

Faktor prediktif yang digunakan secara konvensional adalah status kelenjar getah bening dan ukuran tumor (Rakha *et al.*, 2010). Survival pasien berdasar status KGB (kelenjar getah bening) adalah bila 1-3 KGB yang positif 82,8%; 4-12 KGB 73%; 4-12 KGB



berkisar 45,7%; dan 28,4% untuk KGB >12. Akan tetapi, tidak ada perbedaan survival yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang memiliki pembesaran kelenjar getah bening (KGB) ($p=0,052$). Walaupun begitu, pada penelitian *International Breast Cancer Study Group*, ditemukan 20% metastasis KGB melalui pemeriksaan histopatologi tetapi tidak terdeteksi pembesaran dalam pemeriksaan fisik. Penelitian lain menunjukkan bahwa prediktor yang paling layak untuk menilai respons kemoterapi adalah ukuran tumor (Yu *et al.*, 2007). Pasien dengan ukuran tumor <1 cm memiliki survival rate 99%, 1-3 cm memiliki survival rate 89% dan 86% untuk 3-5 cm. Pada pasien tanpa pembesaran KGB, ukuran tumor menjadi suatu faktor prognosis yang penting dalam terapi di mana ukuran tumor >2 cm memiliki risiko rekurensi 20% (Shien *et al.*, 2009).

Sebuah penelitian terhadap 1928 orang pasien menunjukkan bahwa 91% menunjukkan respons kemosensitifitas yang baik, 6% stabil, dan 3% memburuk. Faktor prediktor utama yang dinilai adalah ukuran tumor ($p=0,002$), klasifikasi histopatologi ($p=0,005$) dan kadar Ki-67 ($p=0,002$), dan status reseptor estrogen/progesteron ($p<0,001$) (Caudle *et al.*, 2010). Banyak sekali faktor-faktor prediktif baik berupa faktor-faktor klinis berupa variasi stadium, variasi histopatologis, maupun faktor-faktor biomolekuler yang nampaknya masih memberikan banyak variasi hasil terapi yang belum bisa menjawab dengan baik prediksi respons kemoterapi, oleh karena itu penelitian-penelitian untuk mengeksplorasi dan menemukan prediktor-prediktor biomolekuler lain masih menjadi sangat penting dan dibutuhkan.

2.6 EMT (epithelial to mesenchymal transtition), Vimentin dan E-cadherin

EMT (*epithelial to mesenchymal transtition*) pada awalnya didefinisikan sebagai gambaran morfologis, namun saat ini tidak hanya dilihat dari sudut pandang morfologis saja tapi juga komponen selular dan faktor molekular. Proses ini melibatkan berbagai jenis sel sehingga transisi selular sangat tergantung pada derajat perubahan dan keterlibatan faktor molekular secara bersamaan. EMT merupakan serangkaian perubahan sel epitel yang mulai kehilangan karakteristiknya melalui jalur sinyal yang melibatkan berbagai molekul protein yang saling berkaitan sehingga menjadi sel yang menunjukkan karakteristik sel



mesenkim yang lebih labil. EMT memfasilitasi pergerakan sel dan menunjang perkembangan jaringan baru yang kemudian berkontribusi pada metastasis sel kanker (Michael *et al.*, 2014).

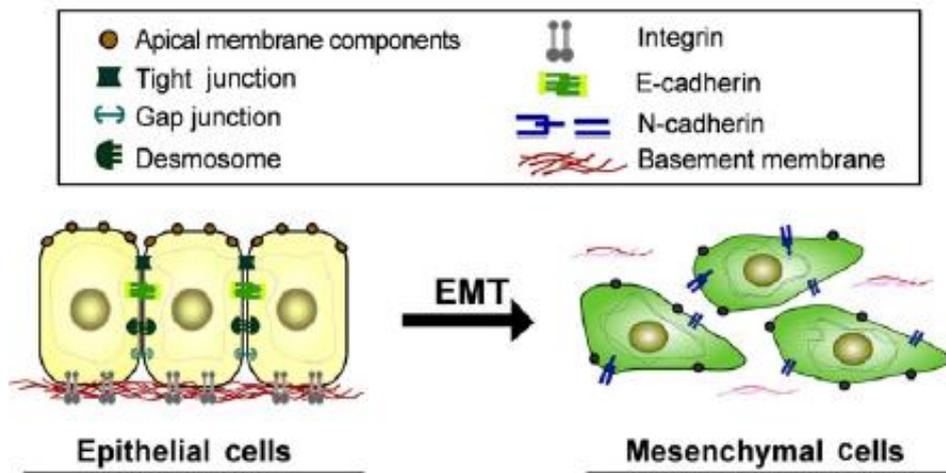
Sel epitel baik secara *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan karakteristik antara lain:

- a. Mempunyai interaksi antar sel sehingga memungkinkan untuk membentuk formasi lapisan sel yang berjajar.
- b. Terdapat 3 tipe bagian membran yaitu apikal, lateral dan basal.
- c. Terdapat *tight junction* antara apikal dan lateral.
- d. Mengandung berbagai organel dan sitoskeleton yang polar.
- e. Tidak ada mobilisasi sel.

Berdasarkan komponen tersebut, lapisan epitel mempunyai fungsi fisiologis diantaranya :

- a. Membentuk lapisan permukaan untuk fungsi pertukaran (epitel alveoli).
- b. Pertukaran molekul makro melalui absorpsi, transitosi dan sekresi.
- c. Melapisi permukaan rongga/lumen (intestinal dan *neural tube*).
- d. Memisahkan kompartemen biologis dengan kesesuaian permeabilitas masing-masing sel (Kalluri *et al.*, 2009).

Gambaran perbedaan antara sel epitel dan sel mesenkim dapat dilihat pada gambar di bawah.



Sumber: Kalluri *et al.* (2009)

Gambar 2.2. Gambaran sel epitel dan mesenkim



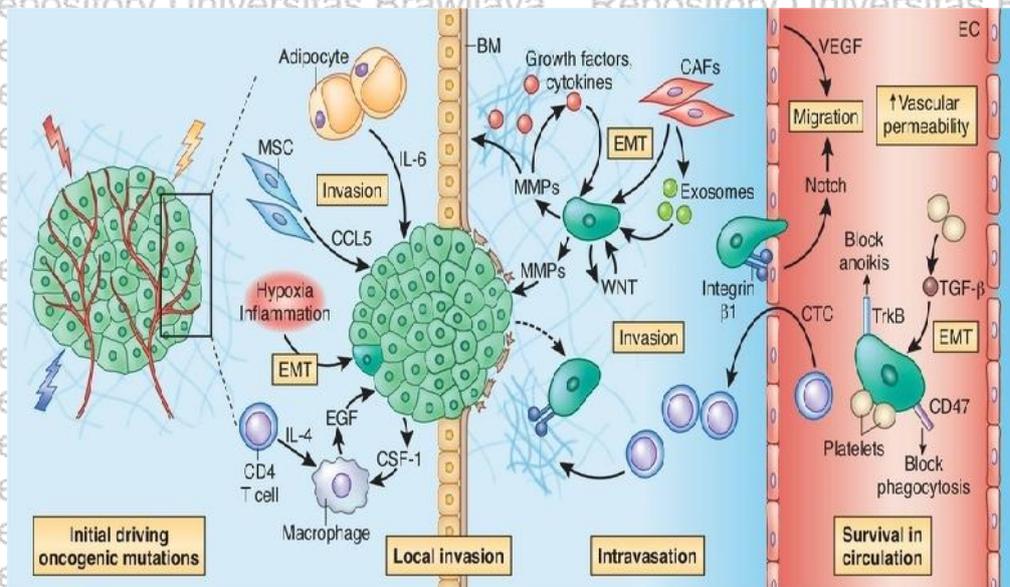
Gambar 2.2. dapat dilihat sel epitel mengandung protein *junctional* khusus, mempunyai bagian apico-basal yang terpolarisasi dengan sedikit kemungkinan untuk terjadi disosiasi dan migrasi. Sel mesenkim tidak mempunyai kompleks adesi dengan bentuk sel yang tidak beraturan dan menunjukkan kemampuan migrasi sel. Selama EMT sel epitel akan berubah menjadi sel mesenkim, termasuk juga terjadi perubahan ekspresi penanda atau marker sel mesenkim. Sel mesenkim juga mempunyai karakteristik tertentu yang berbeda dengan karakter sel epitel, diantaranya :

- a. Tidak ada interaksi antar sel sehingga tidak terbentuk lapisan sel yang bersambung.
- b. Tidak mempunyai membran apikal dan lateral.
- c. Sebaran sitoskeletal dan organel bersifat non polar.
- d. Sel mempunyai kemampuan motilitas dan pada beberapa kasus mempunyai kemampuan invasi.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) merupakan morfogenetik multistep dimana sel epitel mengalami penurunan regulasi komponen epitelial sehingga tidak ada lagi ikatan antar sel dan membentuk karakteristik sel mesenkim (Kalluri *et al.*, 2009). Beberapa kondisi patologis yang terjadi dalam proses EMT di antaranya adalah ketidakstabilan hubungan antar sel, reorganisasi aktin sitoskeleton, peningkatan motilitas dan kemampuan invasi sel, penurunan regulasi dan relokasi dari E-caderin, penurunan regulasi yang menyebabkan translokasi -catenin dari membran sel ke inti sel, peningkatan pengeluaran marker molekuler dari mesenkim seperti Vimentin, Fibronectin dan N-caderin (Dejuan *et al.*, 2011).

EMT ditemukan pada tumor solid berhubungan dengan transisi sel tumor metastasis yang mempunyai kemampuan migrasi melalui sirkulasi darah yang pada sebagian kasus akan membentuk tumor sekunder ditempat lain. Mekanisme EMT membuat sel kanker menjadi sangat invasif dan mampu melakukan metastasis melalui sirkulasi dan sebagai dasar dari munculnya manifestasi sistemik pada progresi tumor ganas. Hal ini dikaitkan dengan peningkatan perubahan sel epitel menjadi sel neoplastik yang mempunyai

karakteristik sel mesenkim yang mempunyai kemampuan invasi dengan motilitas tinggi (Li *et al.*, 2009). Tahapan progresi tumor yang menjelaskan mekanisme EMT pada invasi lokal, intravasasi ke sistem sirkulasi sampai kemampuan survival sel tumor pada sistem sirkulasi dan ekstravasasi ke jaringan baru, dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Sumber: Ghuwalewala *et al.* (2016)

Gambar 2.3. Mekanisme invasi sel pada progresi tumor

Gambar 2.3 menjelaskan bahwa berbagai faktor yang menyebabkan peningkatan aktifitas *oncogenic mutation* akan mengaktifasi EMT dengan peningkatan motilitas sel, merusak hubungan antar sel dan membrana basalis yang memungkinkan intravasasi sel kanker menuju sistem sirkulasi. Di dalam sistem sirkulasi sel kanker mengekspresikan CD44 yang akan melindungi sel kanker dari mekanisme fagositosis dan juga mengekspresikan TrkB yang akan melindungi sel kanker dari mekanisme apoptosis. Kemampuan *homing* sel kanker pada area sekunder sesudah menginvasi sistem sirkulasi dipengaruhi oleh beberapa protein termasuk *solubel mediator (chemotaxic)* atau molekul aktif yang mampu membentuk ikatan permukaan/*active binding to a surface bound molecule (haptotaxis)*. Salah satu kemoatraktan yang memandu sel kanker payudara untuk *homing* adalah RANK dan CXCR-4 (Quail *et al.*, 2014).



EMT merupakan program embrionik yang ditandai dengan hilangnya karakteristik sel epitel dan terbentuknya sel mesenkim yang berperan penting pada mekanisme progresi tumor ganas (EMT tipe III), penyembuhan luka atau regenerasi jaringan (EMT tipe II), serta pada kondisi embriogenesis (EMT tipe I). Mekanisme seluler dari EMT sendiri terjadi akibat rangkaian proses yang dinamik dari beberapa jalur regulasi baik proses intraseluler ataupun interseluler. EMT merupakan rangkaian perubahan sel epitel yang mulai kehilangan karakteristiknya melalui jalur sinyaling yang melibatkan berbagai molekul protein yang saling berkaitan sehingga menjadi sel yang menunjukkan karakteristik sel mesenkim yang lebih labil. Studi mengenai regulasi molekuler dari EMT telah dikemukakan melalui beberapa kajian kultur jaringan yang menunjukkan bahwa beberapa aktifator ekstraseluler bertindak sebagai pencetus proses EMT yang direspons oleh jalur komunikasi seluler antara aktifator dan represor EMT. Aktifasi jalur EMT mempunyai beberapa hasil akhir antara lain penurunan regulasi ekspresi E-caderin dan peningkatan ekspresi dari *EMT associated genes* lainnya. EMT dicetuskan melalui berbagai sinyal ekstraseluler di antaranya komponen *extracellular matrix* (ECM) seperti kolagen dan *hyaluronic acid*, ataupun oleh paparan *soluble growth factor* seperti *transforming growth factor- 2* (TGF- 2), *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF) dan *scatter factor/hepatocyte growth factor* (SF/HGF). Akibat paparan beberapa ligan tersebut di atas akan merangsang *receptor mediated signaling* untuk mengaktifasi molekul efektor intraseluler seperti famili *small GTP-ase -Ras, Rho* dan *Rac-* dan beberapa famili dari *Src Tyrosine-kinase*. Rangkaian aktifasi efektor tersebut akan menyebabkan kerusakan *junctional complex* dan perubahan sitoskeletal, selain itu aktifasi jalur ini juga akan menyebabkan aktifasi regulator transkripsi seperti *Snail (SNAI-1)* dan *Slug (SNAI-2)* yang mengatur perubahan jalur ekspresi gen selama proses EMT. EMT mempermudah pergerakan sel dan menunjang perkembangan jaringan baru yang berperan pada patogenesis penyakit termasuk keterlibatannya pada progresi tumor. Berdasarkan hal tersebut maka identifikasi penanda molekuler EMT mulai diteliti sebagai indikator progresi tumor pada patomekanisme kanker payudara (Kalluri *et al.*, 2009).



EMT sangat berperan pada tahap invasi, hal ini berkaitan dengan serangkaian mekanisme EMT yang menghasilkan kondisi peningkatan motilitas seluler, degradasi membran basalis dan peningkatan ekspresi beberapa gen yang berhubungan dengan plastisitas sel dan kemampuan invasi (Nguyen, 2009). Pada tumor payudara, mekanisme invasi dan migrasi didasari oleh perubahan morfogenesis dari sel epitel normal yang menciptakan kondisi hiperplasia sel dalam bentuk sel yang imatur (progenitor) yang dalam keadaan ganas terjadi perubahan sel yang bersifat mesenkimal. Berdasarkan sifat dasar sel progenitor mempunyai kemampuan invasi secara instrinsik dan mampu melakukan transformasi maligna secara independen. Selanjutnya ekspresi gen yang berperan dalam progresi metastasis pada area tumor primer seperti *PTGS2/ COX2*, *MMP-1*, *EGFRL* akan meningkatkan angiogenesis. Saat gen-gen ini terekspresi pada sel kanker yang ada pada sistem sirkulasi maka rangkaian gen tersebut akan meningkatkan kemampuan sel untuk ekstravasasi dan menyebar menuju jaringan organ jauh, terutama parenkim paru (Li *et al.*, 2009).

2.7 Peranan EMT pada tahap metastasis

Metastasis merupakan proses multistep yang diawali dari pergerakan sel kanker primer menuju organ jauh atau jaringan sekunder. Keseluruhan tahap dalam metastasis tergantung pada kemampuan kesintasan dan kemampuan komunikasi sel kanker sehingga membentuk interaksi yang kompleks dengan matrik ekstraseluler, sitokin, *growth factor*, membrana basalis, lapisan endotel, sel darah dan lingkungan mikro area sekunder dimana sel kanker akan tumbuh dan berkembang membentuk *metastatic focus*. Jalur metastasis diawali kondisi mutasi yang membentuk tumor melalui kemampuan proliferasi yang tidak terbatas, toleransi defek pembelahan sel, ketidakstabilan genom, pertahanan progenitor fenotif dan peran beberapa sel terhadap transformasi sel onkogenik (Nguyen *et al.*, 2009).

Pada proses pembentukan tumor lokal yang agresif (tumor sekunder) maka sel tumor harus masuk dalam sistem sirkulasi kemudian keluar menginfeksi organ jauh, namun mekanisme ini sangat unik karena tidak semua organ mampu memberikan



lingkungan mikro yang memungkinkan sel tumor tetap *survive* yang akhirnya membentuk koloni agresif yang tidak terkendali. Gen dan aktifitas yang menunjang metastasis bekerja melalui beberapa tahap, diantaranya gen yang mengatur metastasis pada tahap awal, progresi dan virulensi metastasis. Pada tahap awal gen metastasis mengendalikan motilitas sel, EMT, degradasi ekstraselular matrik, mobilisasi sel progenitor, angiogenesis dan aktifitas sistem imun. Beberapa gen yang berperan pada tahap awal adalah Snai 1, Snai 2 (Slug). Metastasis diinisiasi oleh supresi *non-coding RNA* seperti Mir-126 dan Mir-335, peningkatan ekspresi gen inisiasi metastasis menunjukkan prognosis buruk pada beberapa tipe kanker (Ellen *et al.*, 2010).

Paparan *growth factor* dapat menghambat p53 yang merupakan *tumor supresor gene*, hal ini akan menstimulasi siklus sel yang berlangsung tanpa melalui *check point* dan menyebabkan pertumbuhan sel tanpa kontrol sebagai mekanisme dasar dari progresi kanker. Selain itu *growth factor TGF-* berperan sebagai pencetus EMT yang paling potensial (Foubert, 2010), dimana EMT berperan pada tahap invasi dan metastasis dari progresi kanker. Pada proses EMT terjadi perubahan bentuk sel epitel menjadi sel mesenkim, dimana sel mesenkim sendiri merupakan sumber produksi *growth factor* sehingga jumlah *growth factor* dalam tubuh sangat berlebihan. Jika *growth factor* menempati reseptor di membran permukaan sel maka ikatan tersebut akan menyebabkan fosforilasi beberapa protein intraseluler yang mengaktifasi jalur sinyal transduksi dan mempengaruhi fungsi sel. Overekspresi *growth factor* akan meningkatkan proliferasi sel dan meningkatkan potensi metastasis yang akan memperburuk prognosis. Blokade *growth factor receptor* akan menghambat proliferasi sel maligna dan juga akan berpengaruh pada fungsi angiogenesis, motilitas sel dan invasi. Sehingga dimungkinkan untuk dikembangkan beberapa obat-obatan yang bersifat kompetitif inhibitor terhadap *growth factor*. Jumlah *growth factor* tidak dipengaruhi oleh agen sitotoksik, hal ini dikarenakan fungsi inhibisi p53 dan mekanisme kerja agen sitotoksik yang hanya berperan pada tahap pembelahan sel.

Sehingga jika *growth factor* tetap ada maka EMT akan terus terjadi dan E-cadherin akan tetap menurun dan sebaliknya terjadi peningkatan Vimentin (Ellen *et al.*, 2010).

EMT pada kanker payudara merupakan tahapan penting dalam proses metastasis dan invasi tumor, serta menunjukkan peningkatan resistensi terhadap apoptosis dan obat-obat kemoterapi (Shih, 2011 dan Hemalatha, 2013). Dalam dekade terakhir beberapa studi menunjukkan bahwa peningkatan Vimentin merupakan penanda terjadinya proses EMT pada kanker payudara yang juga meningkatkan risiko terjadinya metastasis dan prognosis yang lebih buruk (Kallergi *et al.*, 2011). Di sisi lain studi yang dilakukan oleh Hofmann pada tahun 2005 mengukur *soluble E-cadherin* pada 133 orang pasien sebelum dan sesudah diberikan kemoterapi neoajuvan dengan menggunakan *enzyme based immunoassay technique* dan menunjukkan hasil bahwa ada hubungan yang positif antara sE-Cad dengan ukuran tumor pada kondisi pre atau post kemoterapi (Repetto *et al.*, 2014).

2.8 EMT dan resistensi kemoterapi.

Pentingnya EMT secara *in vivo* telah dikaitkan dengan resistensi terhadap kemoterapi pada kanker paru. Resistensi kemoterapi berkorelasi dengan adanya sistem pompa molekul dalam membran sel kanker yang aktif memompa keluar obat kemoterapi dari dalam sel. Hal ini memungkinkan sel-sel tumor untuk menghindari efek toksik dari zat kemoterapi atau proses molekuler lainnya dalam inti ataupun sitoplasma. Sistem pompa ini menjadi penyebab utama terjadinya resistensi kemoterapi pada kanker payudara yang ditandai dengan adanya *P-glycoprotein1* (PGP) yang juga dikenal sebagai MDR1 (*multidrug resistance 1*). Meningkatnya ekspresi MDR1 pada proses EMT berkaitan dengan resistensi sel kanker payudara terhadap kemoterapi antrasiklin (Li *et al.*, 2009).

Satu penelitian multistudi menunjukkan bahwa resistensi sel kanker terhadap obat kemoterapi paklitaksel/doksetaksel dan 5-fluorourasil juga berkaitan dengan mekanisme EMT.

Lebih lanjut *EMT-associated resistant phenotype* dilaporkan juga berhubungan dengan terjadinya resistensi terapi hormonal tamoksifen dan *targetted therapy* lainnya pada *cell-line* kanker payudara. Pada penelitian *cell-line* kanker payudara lainnya juga menunjukkan

bahwa EMT berhubungan dengan resistensi trastuzumab pada *cell-line* kanker payudara dengan ekspresi HER2 positif (Oliveras-Ferraros *et al.*, 2012).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa EMT menjadi mekanisme utama yang mengarah kepada resistensi obat, EMT memainkan peran penting dalam mengatur resistensi sel kanker terhadap kemoterapi, kekambuhan dan juga peningkatan metastasis.

Selama proses EMT, sel-sel epitel kehilangan polaritas sel, interaksi sel-sel dengan sekitar sel tumor atau sel stroma berkurang, dan terjadi peningkatan kemampuan migrasi dan invasi, ketahanan terhadap apoptosis dan kemampuan untuk menekan matriks ekstra selular. Perubahan molekul yang terjadi selama EMT mencakup hilangnya molekul epitel adesi sel seperti E-cadherin, dan munculnya penanda mesenkimal seperti Vimentin dan Fibronektin (Li *et al.*, 2009).

Transformasi *growth factor beta* (TGF- β) sering digunakan untuk menginduksi sel-sel epitel untuk berubah menjadi sel-sel mesenkimal *in vitro*. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa sel-sel kanker payudara dapat mengalami EMT setelah pemberian TGF- β . Pada sel kanker payudara yang diberikan TGF- β terjadi peningkatan resistensi terhadap taxol dan doksorubisin. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa kanker payudara epitelial lebih sensitif terhadap agen kemoterapi, sedangkan sebagian besar sel-sel kanker payudara mesenkimal menunjukkan resistensi terhadap agen kemoterapi (Li *et al.*, 2009).

Program EMT ini dapat diaktifasi oleh berbagai proses seperti perbaikan jaringan, stres patologis, peradangan kronik dan karsinoma stadium lanjut. Semua kondisi ini menimbulkan peningkatan aktifitas *signalling cell* melalui Wnt dan TGF β , sehingga terjadi transisi sel epitel menjadi sel mesenkimal yang dikenal dengan istilah *Epithelial Mesenchymal Transition*. EMT pada umumnya ditandai dengan hilangnya protein E-cadherin sel epitel dan sitokeratin bersamaan dengan munculnya molekul-molekul mesenkimal yang salah satunya adalah Vimentin yang terdapat pada membran basal sel dan termasuk dalam komponen *Ekstra Cellular Matrix/ECM* (Kalluri *et al.*, 2009).





Obat kemoterapi umumnya memicu apoptosis termasuk siklofosamid, 5-fluorodeoksiuridin, 5-fluorourasil, dan antrasiklin (doksorubisin dan epirubisin). Kemoterapi ini menginduksi kerusakan DNA dan ekspresi p53 yang berperan penting dalam mengatur apoptosis sel melalui regulasi protein proapoptotik (Bax) dan regulasi negatif protein Bcl-2. Selanjutnya p53 menginduksi gen Bax dan mengekspresi antigen Fas maupun menekan secara simultan proto-onkogen seperti Bcl-2, karena itu penurunan ekspresi p53 ini akan menyebabkan terjadinya resistensi (Hamilton *et al.*, 2000).

Vimentin yang diekspresi karena proses EMT akan berikatan dengan reseptor yang terdapat pada permukaan sel dan mempengaruhi molekul adesi sel-sel lainnya. Ikatan ini menghasilkan sinyal yang berasal dari matriks ekstraseluler dan diteruskan ke sitoplasma, yang selanjutnya dapat mengaktifkan jalur sinyal intrasel yang salah satunya adalah *signalling* ERK (*Extracellular Sinyal-Regulated Kinases*). Sinyal pada sel ini menyebabkan I κ B (*Inhibitor Kappa Beta*) mengalami fosforilasi dan terurai. Sehingga NF κ B (*Nuclear Faktor Kappa Beta*) akan teraktifasi dan bermigrasi ke dalam nukleus merangsang faktor transkripsi gen spesifik yang menyandi protein (*survival* dan apoptosis) yang berperan penting dalam siklus sel, diantaranya adalah protein anti apoptosis Bcl-2 dan protein proliferasi yaitu Myc. Ketika p53, Bax dan Bad mempromosikan kematian sel, Bcl-2 dan Bcl-xl bekerja berlawanan proses tersebut. Sedangkan E-cadherin merupakan protein adesi transmembran yang sangat tergantung pada kadar kalsium dengan berat molekul 120 kDa dan terletak pada adherens junction, protein ini sering disebut sebagai marker sel epitel normal (Chen *et al.*, 2014).

Banyak penelitian klinis melakukan analisis terhadap hubungan mekanisme EMT dengan prognosis pasien yaitu survival penderita kanker payudara. Berbagai penelitian yang menganalisis hubungan klinis marker yang berhubungan dengan EMT dapat dilihat pada gambar di bawah:

Study	N	Method	Markers	Clinical Outcome	p-Value
Lin <i>et al.</i> [26]	441	IHC	Low E-cadherin, High Slug, High Vimentin	Associated with Low DFS and Low OS	<0.01
Aleskandarany <i>et al.</i> [27]	1035	IHC, RPPA	Low E-cadherin and High N-cadherin	Associated with Low DFS and Low OS	<0.001
Wu <i>et al.</i> [37]	126	IHC	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ vs. CD44 ⁻ /CD24 ⁻ ; CD24 ⁺ /CD44 ⁻ vs. CD44 ⁻ /CD24 ⁻	Associated with Low DFS	0.05 0.016
Lin <i>et al.</i> [40]	147	IHC	CD44 ^{high} /CD24 ^{low}	Associated with Low DFS and Low OS	<0.05
Ma <i>et al.</i> [98]	45	RT-qPCR	miR9	Associated with Metastasis	<0.01
Bonnie <i>et al.</i> [127]	492	IHC	Low E-cadherin	Increased HR of all-cause mortality	<0.05
Khramtsov <i>et al.</i> [128]	117	IHC	High cytosolic β -catenin Or High or High nuclear β -catenin	Associated with Low OS	0.0005 0.039
Martin <i>et al.</i> [129]	190	RT-qPCR	High Twist High Snail High Slug	High mortality High mortality High metastasis	n.s. n.s. 0.05
Mylona <i>et al.</i> [130]	155	IHC	CD44 ⁺ /CD24 ⁻ ; CD24 ⁺ /CD44 ⁻	No association with DFS and OS; Associated with low DFS and OS	n.s. <0.05
Gwak <i>et al.</i> [131]	295	IHC, RT-qPCR	miR9	Associated with low DFS and OS	<0.05

Sumber: Wei, *et al.* (2012)

Gambar 2.4 Hubungan klinis marker yang berhubungan dengan EMT

Gambar 2.4 menggambarkan studi klinis nilai prognostik marker survival yang berhubungan dengan EMT, tampak bahwa semua data di atas menunjukkan prognosis penderita dan kesintasan pasien, tapi tidak ada studi yang meneliti marker prediktif biologi yang jelas terhadap terapi dan resistensi kemoterapi. Karena itu perlu dilakukan penelitian dan pengembangan untuk menemukan biomarker prediktor yang lebih baik yang berhubungan dengan EMT dan resistensi kemoterapi untuk kepentingan klinis selanjutnya (Wei *et al.*, 2012).

Berdasarkan data dari penelitian terhadap model kultur *in vitro*, peran EMT pada terjadinya resistensi kemoterapi maupun *targetted therapy* lainnya menjadi perhatian dan terus diteliti. Beberapa penelitian lain mengalami kesulitan karena adanya keterbatasan pada desain penelitian dan jumlah sampel yang kurang, karena itu dibutuhkan penelitian klinis yang bisa menghubungkan EMT dengan terjadinya resistensi terapi. Seperti disebutkan di atas bahwa sebagian besar penelitian yang menghubungkan progresifitas sel kanker dan resistensi kemoterapi dilakukan pada *cell line* kanker dan binatang coba, karena itu relevansinya pada sel kanker manusia masih menjadi sangat penting dan perlu dilakukan

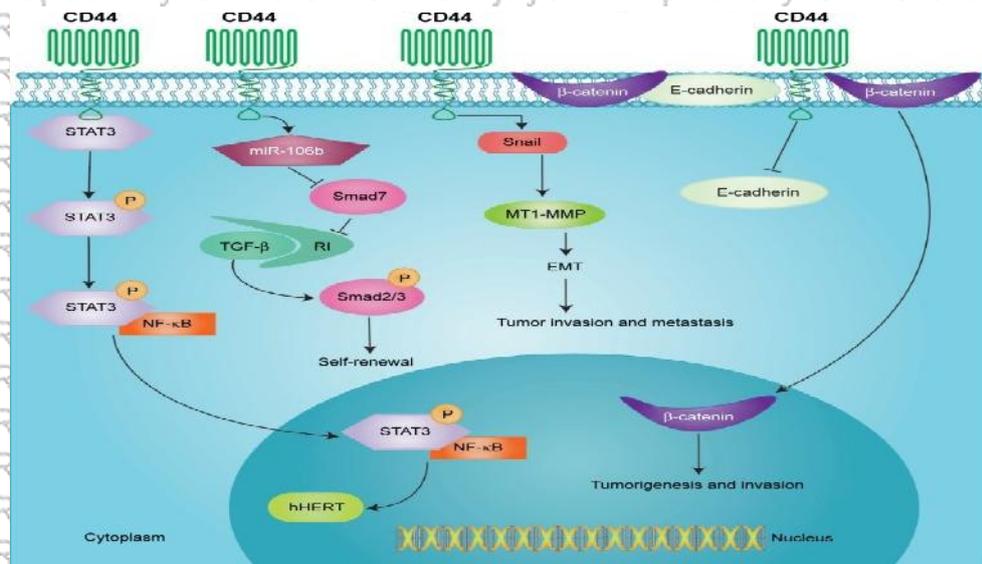


penelitian lebih lanjut. Penemuan biomarker valid yang berhubungan dengan EMT menjadi sangat penting di dalam menilai terjadinya resistensi kemoterapi dan metastasis. Penemuan prediktor biologis langsung pada pasien dapat memberikan informasi langsung mengenai prediksi pasien dan sangat penting dalam menentukan pemilihan protokol terapi yang lebih selektif dan juga akan menentukan seberapa agresif kita memberikan terapi selanjutnya.

2.9 Peranan protein CD44 dan CD24 pada EMT dan resistensi

CD44 merupakan suatu kompleks glikoprotein transmembran dengan berat 80 – 85 kDa, yang mempunyai peranan baik dalam proses fisiologis maupun proses patologis, adesi sel, inflamasi dan perkembangan tumor. Ekspresi CD44 diregulasi oleh faktor intraseluler ataupun ekstraseluler, dimana CD44 merupakan target pada jalur Wnt (Hanxiao *et al.*, 2015). CD44 merupakan reseptor glikoprotein transmembran yang berperan dalam adesi sel, dan ekspresinya di regulasi oleh kondisi lingkungan mikro yang hipoksia. Overekspresi CD44 ditemukan pada progresi kanker yang agresif sehingga memungkinkan CD44 menjadi target pengembangan terapi untuk eliminasi sel kanker yang agresif (Jin *et al.*, 2016). Pada kebanyakan kasus kanker CD44 terekspressi pada permukaan sel kanker yang berperan besar pada tahap inisiasi, metastatik dan tumorigenesis (Appalaraju *et al.*, 2012). Karakter sel yang mengekspresikan CD44 menunjukkan perilaku sel yang lambat membelah, dan mempunyai tingkat resistensi yang tinggi terhadap kemoterapi dan radiasi. Sel yang mempunyai kecepatan pembelahan lambat tidak bisa menjadi sasaran dari kebanyakan rejimen kemoterapi, karena mekanisme umum kemoterapi adalah menghambat fase sel yang sedang membelah dengan cepat, baik itu sel tumor maupun sel yang sehat, termasuk leukosit dan prekursor *bone marrow* (Genevieve *et al.*, 2011). Kemoterapi sebenarnya efektifitasnya tidak bekerja pada semua pasien kanker mengingat pada kanker dengan pembelahan sel yang lambat atau jenis *tumor arrested in growth* efektifitas kemoterapi sulit diharapkan. Dalam aplikasi laboratorium pemeriksaan ekspresi CD44 dan CD24 menjadi satu paket pemeriksaan yang dapat dilakukan analisis dengan baik. Menurut Brunna *et al.* (2014) melalui studi *invivo* maupun *invitro* menunjukkan bahwa ZEB 1 (faktor transkripsi)

mempunyai korelasi yang signifikan dengan ekspresi CD44 pada jaringan tumor. Diketahui bahwa overekspresi dari ZEB 1 mampu menginduksi EMT, dan ZEB 1 berperan dalam melawan kemampuan motilitas dan invasi dari sel kanker (Hanxiao *et al.*, 2015). Mekanisme dan jalur sinyaling yang di induksi oleh CD 44 dapat dilihat pada gambar di bawah.



Sumber: Hanxiao *et al.* (2015)

Gambar 2.5. Representasi jalur sinyaling yang di induksi oleh CD 44

Gambar 2.5 di atas dijelaskan bahwa pada kanker payudara CD44 menyebabkan fosforilasi STAT3, sehingga STAT3 mengalami translokasi ke nukleus dan berikatan dengan NFκB untuk mengaktifkan hTERT yang selanjutnya akan meningkatkan ekspresi dari CD44. Selain itu peningkatan aktivitas gen yang menghambat ekspresi E-cadherin selama EMT akan juga berdampak pada terlepasnya ikatan kompleks E-cadherin dan E-catenin yang secara fisiologis berperan dalam menjaga kompleks sel-sel adesi. Terlepasnya ikatan kompleks E-cadherin dan E-catenin akan menyebabkan translokasi E-catenin ke nukleus dan menyebabkan peningkatan ekspresi berbagai jenis *growth factor* dan mengaktifasi gen yang berhubungan dengan invasi dan migrasi sel (ZEB dan Snail). Sedangkan perubahan bentuk CD44 dianggap sebagai penentu pada aktifitas EMT, perubahan isoform CD44 menjadi

CD44s penting untuk EMT pada kanker payudara dimana perubahan itu akan mengaktifasi *signaling* Akt yang kemudian akan meningkatkan aktivitas EMT (Hanxiao *et al.*, 2015).

Telah dijelaskan bahwa peningkatan ekspresi CD44 berhubungan dengan ekspresi profil EMT, dimana ekspresi CD44 berbanding terbalik dengan E-cadherin dan menunjukkan hubungan yang positif dengan ekspresi Vimentin (Mima *et al.*, 2013).

Tampilan CD44 yang berhubungan dengan EMT merupakan kombinasi dengan molekul lain seperti CD29 dan CD24. Penelitian lain menunjukkan bahwa pada kanker payudara ekspresi CD44/CD24 berhubungan dengan berbagai ekspresi gen terkait EMT seperti Vimentin, Zeb1, Zeb2, -catenin, dan Matriks metaloproteinase-1. Telah disampaikan bahwa karakter sel yang mengekspresikan CD44 menunjukkan perilaku sel yang lambat membelah, mempunyai tingkat resistensi yang tinggi pada kemoterapi primer dan radiasi (Ghuwaewala *et al.*, 2016).

Berbeda dengan CD44, maka CD24 merupakan molekul protein yang dapat dijumpai di permukaan sel yang tertambat pada glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) (Appalaraju *et al.*, 2012). Twist juga dianggap sebagai represor transkripsi dari CD24 dan memungkinkan peningkatan kemampuan resistensi sel kanker terhadap kemoterapi melalui kemampuan sel melakukan *reflux* obat kemoterapi keluar dari intrasel (Farhad *et al.*, 2009). Baumann *et al.* (2005) menunjukkan CD24 dapat meningkatkan kemampuan invasi, sedangkan Schabath *et al.* (2006) menunjukkan ekspresi CD24 menghambat invasi dan metastasis. Pada intinya nilai prognostik dari protein penanda ini pada kasus kanker payudara masih kontroversi sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut tentang keterbatasan yang berkaitan dengan ekspresi CD24 (Appalaraju *et al.*, 2012).

Kesimpulan sebuah studi oleh dinyatakan bahwa sel payudara manusia epitelial/*human mammary epithelial cells* (HMLE) mengekspresikan CD44+(tinggi) dan CD24-(rendah) menunjukkan sel yang mempunyai fenotip mesenkimal yang telah mengalami proses EMT. Fenotip sel yang mengekspresikan CD44+ dan CD24-

meningkatkan level ekspresi Snail, Slug, Twist, N-cadherin dan menurunkan E-cadherin. Dari studi klinis *in vitro* cell-line dan *in vivo* binatang coba tikus menunjukkan bahwa sel



dengan fenotipe CD44+ dan CD24- menunjukkan sel kanker tersebut berhubungan dengan peningkatan risiko metastasis jauh yang lebih tinggi (Mima *et al.*, 2013).

Data dari satu studi prospektif berhasil diidentifikasi dan diisolasi sel-sel tumorigenik yang mengekspresikan CD44+ dan CD24- pada delapan dari sembilan pasien. Sedikitnya 100 sel dengan fenotipe ini mampu membentuk tumor pada tikus, sedangkan puluhan ribu sel-sel dengan fenotipe lainnya gagal untuk membentuk tumor. Selanjutnya dalam pembiakan subpopulasi sel yang mengandung CD44+ dan CD24- ini menghasilkan sel subpopulasi yang bersifat tumorigenik dan mengandung sel-sel tumor baru yang mengandung CD44+ dan CD24-. Keberhasilan secara prospektif mengidentifikasi *tumorigenic marker* sel-sel kanker ini akan memudahkan penjelasan jalur yang mengatur pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel kanker payudara. Selain itu, pemahaman tentang sel-sel yang mengekspresikan CD44+ dan CD24- yang memicu perkembangan tumor, maka dimungkinkan didapatkannya strategi untuk memberikan terapi yang lebih efektif (Al-Hajj *et al.*, 2013).

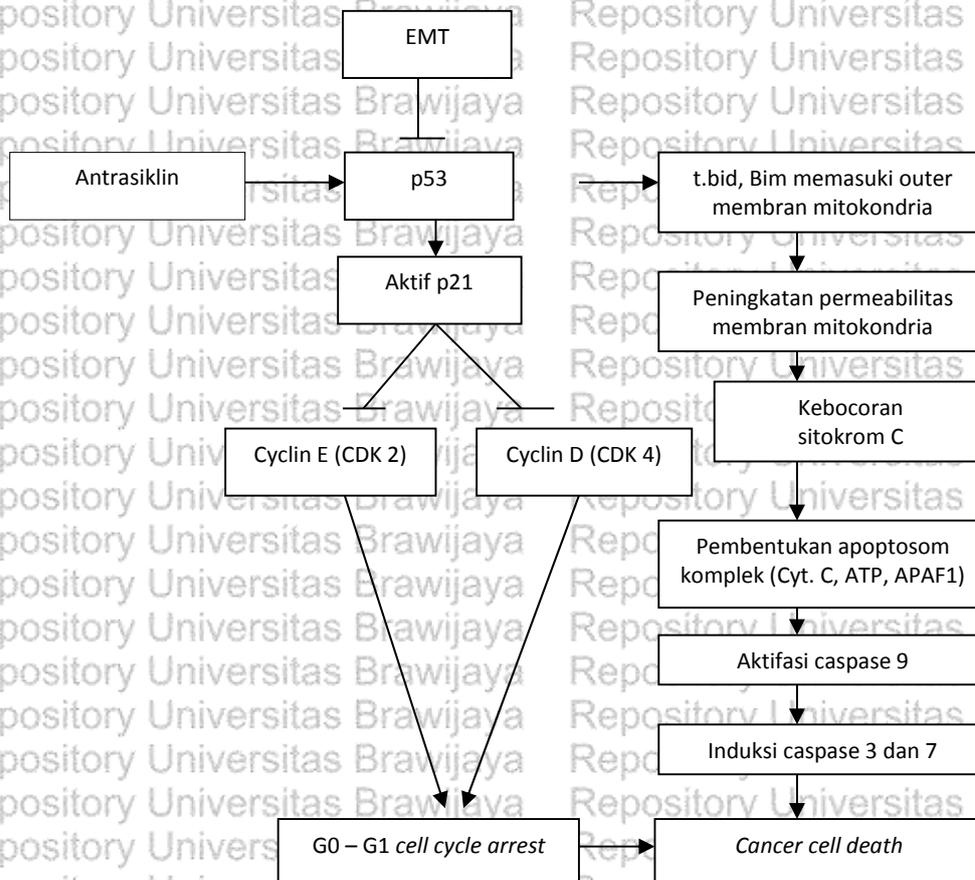
2.10. Kemoterapi neoajuvan antrasiklin dan EMT

Semua obat kemoterapi berfungsi untuk membatasi pertumbuhan dan progresi sel kanker melalui peningkatan aktifitas apoptosis melalui jalur p53, induksi p21 dan pembentukan apoptosom. Berikut ini akan dijelaskan lebih lanjut tentang peranan agen kemoterapi neoajuvan pada mekanisme EMT.

Pada satu uji *in silico* dengan uji docking molekuler menunjukkan bahwa doksorubisin menghambat PI3K secara kompetitif dengan ATP. Penghambatan PI3K/Akt oleh doksorubisin dapat memacu terjadinya apoptosis. Perlu diketahui bahwa doksorubisin adalah salah satu regimen kemoterapi jenis antrasiklin. Pemberian kemoterapi doksorubisin akan mengganggu fungsi p53. Sehingga akan berpengaruh pada pemacuan apoptosis dan *cell cycle arrest*. Penelusuran lebih lanjut didapatkan bahwa peningkatan apoptosis

melalui p53 *independent pathway* memang masih perlu dilakukan untuk mengetahui fokus target doksorubisin (Lacroix *et al.*, 2006).

Mekanisme terjadinya epithelial to mesenchymal transition (EMT) dengan resistensi kemoterapi dapat digambarkan di dalam bagan di bawah.



Gambar 2.6. Mekanisme EMT pada resistensi kemoterapi antrasyklin



Apoptosis pada sel kanker payudara yang mengalami mutasi p53 melalui jalur Fas/caspase 8 dan Akt/ Bad. Fas mengaktifkan pro-caspase-8/10 kemudian dilanjutkan dengan aktivasi caspase-3, 6, 7 yang mengeksekusi apoptosis. Caspase-8 juga mengaktifkan t-Bid yang memacu mitokondria untuk melepaskan sitokrom-C yang selanjutnya membentuk apoptosome dengan Apaf-1 dan dATP. Caspase-3 juga teraktifkan pada sel kanker payudara yang diberikan doksorubisin. Doksorubisin juga terbukti mampu menginduksi apoptosis melalui peningkatan aktivasi Fas pada sel kanker payudara (El-Mahdy *et al.*, 2005).

Dari sebuah data yang dianalisis menunjukkan bahwa EMT yang diinduksi oleh faktor-faktor Snail dan Twist akan meningkatkan ekspresi p53 mutan dan KRAS-G12D, sehingga akan terjadi peningkatan metastasis dan resistensi kemoterapi (Zheng *et al.*, 2015). Demikian pula dengan Fisher *et al.* menunjukkan bahwa EMT yang terjadi melalui aktivasi jalur Snail dan Twist berhubungan dengan peningkatan metastasis dan peningkatan resistensi kemoterapi. Hubungan secara langsung antara EMT dengan resistensi kemoterapi memang belum jelas, tetapi pada penelitian terhadap binatang coba tikus (mice) jelas sekali nampak bahwa supresi terhadap EMT meningkatkan sensitivitas kemoterapi dan memperbesar angka kesintasan (Zheng *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2015).

2.11. Interaksi protein

Protein adalah molekul yang sangat penting dalam sel, sebagian besar fungsi protein adalah berinteraksi dengan molekul lain, terutama dengan sesama protein. Interaksi protein mengalami regulasi dan terkonservasi pada evolusi. Hal ini terjadi karena interaksi tidak sempurna yang dipicu oleh mutasi random, dapat menyebabkan disfungsi molekul.

Oleh sebab itu, area interaksi interface molekul berada dibawah tekanan oleh seleksi alam dan lebih terpelihara dibandingkan dengan bagian lain pada protein. Sejalan dengan semakin lengkapnya sekuens genom, 'interaktomik struktural' protein untuk memetakan semua interaksi domain protein menjadi semakin penting. Sekarang ilmuwan dapat memetakan seluruh interaktom manusia secara, namun masih banyak sekali rahasia yang



belum terungkap, karena itu pemahaman tentang interaksi protein dengan protein (PPI) menjadi sangat penting (Gong *et al.*, 2005).

Protein dapat berinteraksi dengan banyak jenis molekul. Interaksi ini dapat berupa intermolekular (antara protein dan bagian yang melekat secara kovalen) atau intramolekul (interaksi protein non-kovalen dengan molekul lain). Interaksi semacam itu terkait dengan fungsi mereka dan karena itu merupakan obyek studi dalam biologi molekular. Interaksi protein dapat diklasifikasikan sebagai:

- Interaksi protein-ligan
- Interaksi protein-protein (PPI)
- Interaksi protein-lipid
- Interaksi protein-karbohidrat
- Interaksi protein-polinukleotid
 - Interaksi Protein-DNA
 - Interaksi protein-polifenol
- Interaksi protein-pelarut

Interaksi antar protein (*protein-protein interaction*) yang selanjutnya disingkat PPI adalah kontak fisik spesifik yang terbentuk antara dua atau lebih molekul protein sebagai akibat dari peristiwa biokimia yang dikendalikan oleh gaya elektrostatik termasuk efek hidrofobik. Banyak kontak fisik dengan asosiasi molekular antara rantai yang terjadi dalam sel atau organisme hidup dalam konteks biomolekular tertentu. Protein jarang bertindak sendiri karena fungsinya cenderung diatur secara sistemik. Banyak proses molekular dalam sel dilakukan oleh mesin molekular yang dibangun dari sejumlah besar komponen protein yang diatur oleh interaksi protein dengan protein. Interaksi ini membentuk apa yang disebut *interactomics* organisme, sementara interaksi protein dengan protein (PPI) yang menyimpang adalah dasar dari beberapa penyakit terkait agregasi, seperti Creutzfeldt-Jakob, penyakit Alzheimer, dan dapat menyebabkan kanker. PPI telah dipelajari dari perspektif yang berbeda secara biokimia, kimia kuantum, dinamika molekular, dan



transduksi sinyal. Aktifitas sel diatur oleh sinyal ekstraseluler. Penghantaran sinyal di dalam dan atau di sepanjang bagian dalam sel tergantung pada interaksi protein dengan protein (PPI) antara berbagai molekul sinyal. Rekrutmen jalur sinyal melalui PPI disebut transduksi sinyal dan memainkan peran mendasar dalam banyak proses biologis dan dalam banyak penyakit termasuk penyakit degeneratif dan kanker (Archakov *et al.*, 2003).

Penggambaran jenis interaksi antar protein atau (*protein-protein interaction*, PPI) penting untuk memikirkan bahwa protein dapat berinteraksi dengan cara sementara (untuk menghasilkan beberapa efek spesifik dalam waktu singkat) atau untuk berinteraksi dengan protein lain dengan cara permanen untuk membangun kompleks multiprotein yang merupakan mesin molekular dalam sistem kehidupan. Suatu penyusunan kompleks protein dapat menghasilkan pembentukan kompleks homooligomer atau heterooligomer. Selain kompleks konvensional, sebagai penghambat enzim dan antigen antibodi, interaksi juga dapat dibentuk antara domain-domain dan domain-peptida. Interaksi yang melibatkan protein yang berinteraksi untuk waktu yang lama, akan mengambil bagian dari kompleks permanen sebagai subunit, untuk melaksanakan peran struktural atau fungsional. Ini biasanya kasus homo-oligomer (misalnya sitokrom c), dan beberapa protein hetero-oligomer, sebagai subunit ATPase. Di sisi lain, protein dapat berinteraksi secara singkat dan reversibel dengan protein lain hanya dalam konteks seluler tertentu, tipe sel, tahap siklus sel, faktor eksternal, keberadaan protein pengikat lainnya, seperti yang terjadi pada sebagian besar protein yang terlibat dalam kaskade biokimia, interaksi ini disebut disebut interaksi transien. Sebagai contoh, beberapa reseptor berpasangan protein G hanya terikat secara sementara ke protein G10 ketika mereka diaktifkan oleh ligan ekstraseluler (Salwinski, 2004).

Interaksi molekular dapat terjadi antara molekul yang termasuk keluarga biokimia yang berbeda (protein, asam nukleat, lipid, karbohidrat, dll., tapi juga dapat terjadi di dalam satu famili misalnya protein dengan protein. Setiap kali molekul-molekul tersebut dihubungkan oleh interaksi fisik, mereka membentuk *network* interaksi molekular yang



umumnya diklasifikasikan oleh sifat dari senyawa yang terlibat. Paling sering, interactome mengacu pada interaksi protein-protein, misalnya protein interactome Sirt-1 dan interactome ds famili Sirt family adalah satu *network* yang melibatkan Sirt-1 dan berinteraksi langsung dengan protein di mana sebagai urutan kedua interactome menggambarkan interaksi antara protein yang berfungsi dan berposisi berdekatan. Jenis interaksi yang lain adalah protein dengan DNA interactome, yang juga disebut *network* pengaturan gen, *network* yang dibentuk oleh faktor transkripsi, protein pengaturan kromatin, dan gen target. Bahkan *network* metabolik dapat dianggap sebagai *network* interaksi molekular metabolit, yaitu senyawa kimia dalam sel, diubah menjadi satu sama lain oleh enzim, yang harus mengikat substrat mereka secara fisik. Faktanya, semua jenis yang berinteraksi saling berhubungan, sebagai contoh, protein interctome mengandung banyak enzim yang pada gilirannya membentuk *network* biokimia. Demikian pula, *network* regulasi gen dapat tumpang tindih secara substansial dengan *network* interaksi protein dan *network* pensinyalan (Gong *et al.*, 2015).

Proses komunikasi sinyal di dalam sel-sel dibagi menjadi tiga tahap, yaitu:

1. Penerimaan (*reception*) , merupakan pendeteksian sinyal yang berasal dari luar sel target. Sinyal kimiawi ini akan terdeteksi apabila sinyal terikat pada protein seluler yang ada pada permukaan sel yang target.
2. Transduksi sinyal, tahapan ini diawali dengan pengikatan molekul sinyal yang mengubah protein reseptor. Pada tahap ini akan ada perubahan sinyal menjadi satu bentuk yang dapat menimbulkan respons seluler spesifik. Transduksi sinyal ini dapat terjadi melalui satu langkah, namun lebih sering terjadi melalui serangkaian langkah urutan perubahan dalam sederet molekul yang berbeda jalur transduksi sinyal.

Transduksi sinyal meliputi aktifitas sebagai berikut:



a. Pengenalan berbagai sinyal dari luar terhadap reseptor spesifik yang terdapat pada membran permukaan sel.

b. Penghantaran sinyal melalui membran sel dalam sitoplasma. Penghantaran sinyal pada molekul efektor spesifik pada bagian membran sel atau efektor spesifik dalam sitoplasma. Hantaran sinyal spesifik ini kemudian menimbulkan respon spesifik terhadap sinyal tersebut. Respons spesifik yang timbul tergantung pada jenis sinyal yang diterima. Respons dapat berbeda berupa peningkatan atau penurunan aktifitas dari enzim-enzim, metabolik, rekonfigurasi sitoskeleton, perubahan permeabilitas membran sel, aktifasi sintesis DNA, perubahan ekspresi protein ataupun aktifasi program apoptosis.

3. Terputusnya rangkaian sinyal terjadi apabila rangsangan dari luar mulai berkurang, terputusnya sinyal juga akan terjadi apabila terdapat tidak aktifnya sebagian atau pun semua molekul penghantaran sinyal (Reynolds *et al.*, 2008).

2.12. Interaksi genetik kanker

Interaksi genetik kanker adalah keadaan saling mempengaruhi antar beberapa gen yang mengalami mutasi. Tipe interaksi gen merupakan hasil interaksi diantara gen-gen dan menghasilkan produk dari aktivitas 2 gen atau lebih. Interaksi ini mungkin berada pada level gen-gen itu sendiri, aksi dari produk-produk yang dihasilkan pada kegiatan sitoplasma atau merupakan interaksi sel-sel atau organ-organ yang gen-gennya mengalami perubahan. Produk dari semua aspek fenotipe bergantung pada keseluruhan gen yang membentuk genome. Seiring dengan perkembangan waktu maka penelitian-penelitian yang menjelaskan tentang interaksi gen semakin berkembang. Salah satunya adalah dipahaminya bahwa dominansi suatu alel terhadap alel lain tidak selalu terjadi. Perubahan pengaruh dominansi ini timbul akibat perubahan intralokus atau intralelik atau intragenik, perubahan interlokus atau intergenik dan perubahan interaksi gen dengan lingkungan

Analisis genetik dapat mengidentifikasi gen yang berinteraksi dalam menentukan suatu sifat atau gen-gen yang terdapat dalam lintasan biologi yang khusus. Kunci utamanya adalah bahwa interaksi gen menyebabkan perubahan rasio turunan. Terdapat beberapa jenis interaksi yang menimbulkan berbagai modifikasi fenotipe. Perbedaan penting adalah adanya interaksi gen yang berada dalam lintasan biologi yang sama dan terdapat juga interaksi gen yang berada dalam lintasan yang berbeda, antara lain (Tischler *et al.*, 2008):

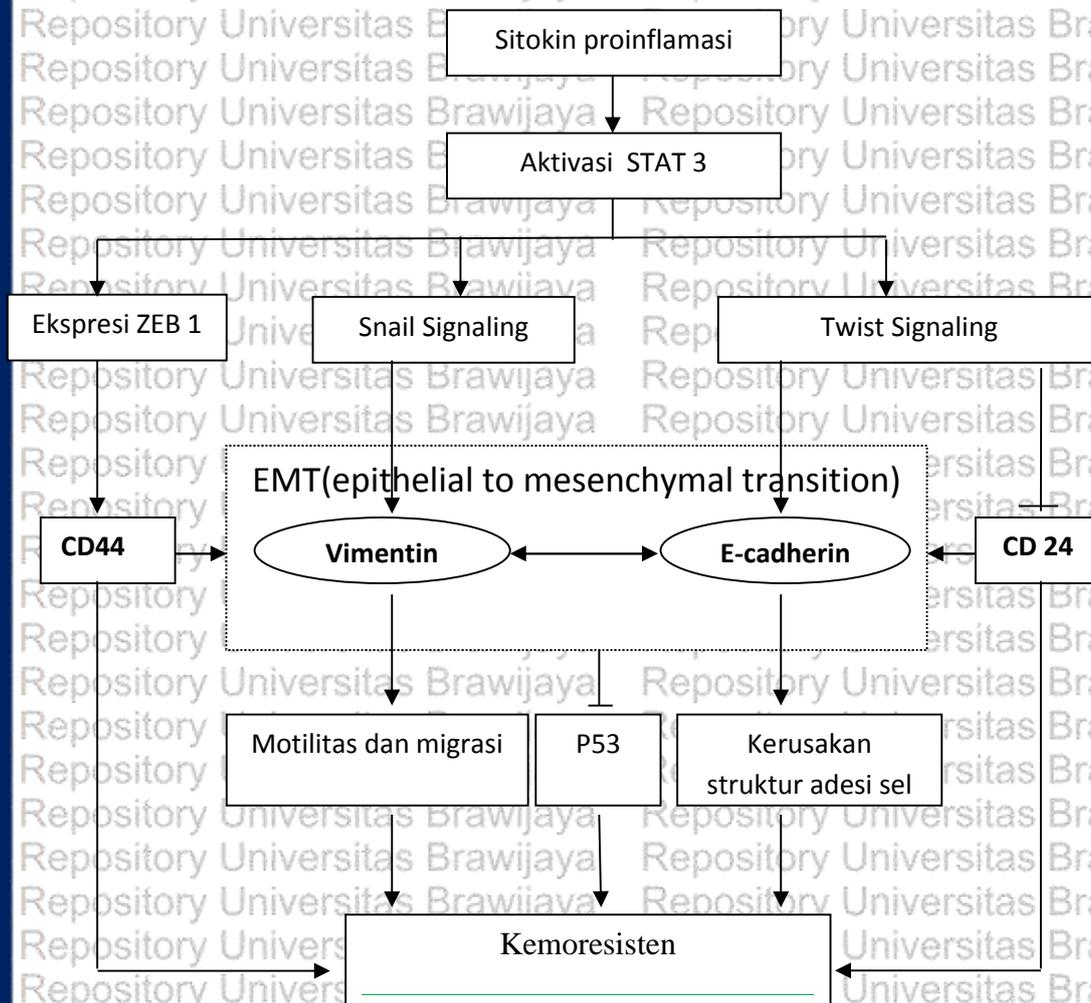
1. Interaksi gen dalam lintasan biologi yang berbeda
2. Interaksi gen dalam lintasan biologi yang sama
 - a. Intralokus atau intralelik atau intragenik adalah interaksi yang terjadi antar 2 atau lebih alel yang berasal dari lokus yang sama, untuk menghasilkan suatu fenotipe.
 - b. Interlokus atau intergenik

Interaksi ini merupakan peristiwa dimana dua atau lebih gen kanker dari lokus yang berbeda berinteraksi mempengaruhi suatu karakter dan suatu gen/lokus menutupi gen/lokus kanker lainnya dan dikenal dengan istilah epistasi. Epistasis artinya menutupi gen lain dan gen yang ditutup disebut juga dengan hipostatis. Pemunculan sifat satu alel dapat berubah karena adanya kehadiran atau ketidakhadiran salah satu alel atau lebih pada lokus yang berlainan. Proses ini berlangsung bila paling sedikit ada 2 lokus yang mengendalikan pemunculan satu sifat/karakter kanker (Asworth *et al.*, 2011).

Masih banyak hal yang masih menjadi misteri di dalam pemahaman interaksi, diantaranya interaksi antar protein dengan protein di dalam proses penghantaran transduksi sinyal, demikian pula di dalam interaksi antar genetik di dalam karsinogenesis. Sangat mungkin terjadi interaksi di dalam pensinyalan transduksi antar protein mau pun interaksi genetik antara gen-gen Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24, sehingga mempunyai pengaruh yang berbeda ketika protein-protein tersebut bekerja sendiri-sendiri di dalam mekanisme EMT dengan ketika semua protein marker tersebut bekerja bersama-sama dimana akan terjadi interaksi yang saling berpengaruh secara keseluruhan terhadap progresifitas sel kanker payudara maupun respons terhadap kemoterapi.

2.13. Kerangka teori

Berdasarkan berbagai teori dan data temuan hasil penelitian-penelitian di dalam studi pustaka di atas maka dapat disusun kerangka teori di bawah ini.



Gambar 2.7. Kerangka teori

Gambar 2.3 menjelaskan progresifitas kanker akibat *crossstalk* berbagai protein yang terlibat membentuk lingkungan mikro tumor dipengaruhi oleh paparan *growth factor*, kondisi hipoksia dan sitokin proinflamasi yang akan mengubah ekspresi berbagai gen seperti ZEB1.

Gen tersebut akan meningkatkan ekspresi sebagian gen serta menekan ekspresi gen yang lain pula seperti gambaran keterlibatan dan peran ZEB1 pada aktivasi *epithelial to mesenchymal transition* (EMT). Aktifitas EMT menyebabkan perubahan ekspresi baik pada protein E-cadherin maupun Vimentin serta ekspresi dari CD44 dan CD24. Telah diketahui



bahwa aktivasi EMT akan berdampak pada perubahan kemampuan sel menjadi lebih invasif dengan motilitasnya yang tinggi sehingga memungkinkan sel kanker untuk menembus sirkulasi dan menyebabkan metastasis kanker di area sekunder. Namun perubahan ekspresi CD44 dan CD24 belum bisa dijelaskan keterkaitannya terhadap progresifitas kanker, diduga bahwa peningkatan ekspresi CD44 dan CD24 berhubungan dengan kecenderungan resistensi kemoterapi. Sehingga dimungkinkan analisis sebuah logika bahwa penurunan atau blokade pada aktivasi EMT akan mengakibatkan penghambatan progresivitas sel kanker, penurunan risiko metastasis kanker, dan peningkatan respons kemoterapi.

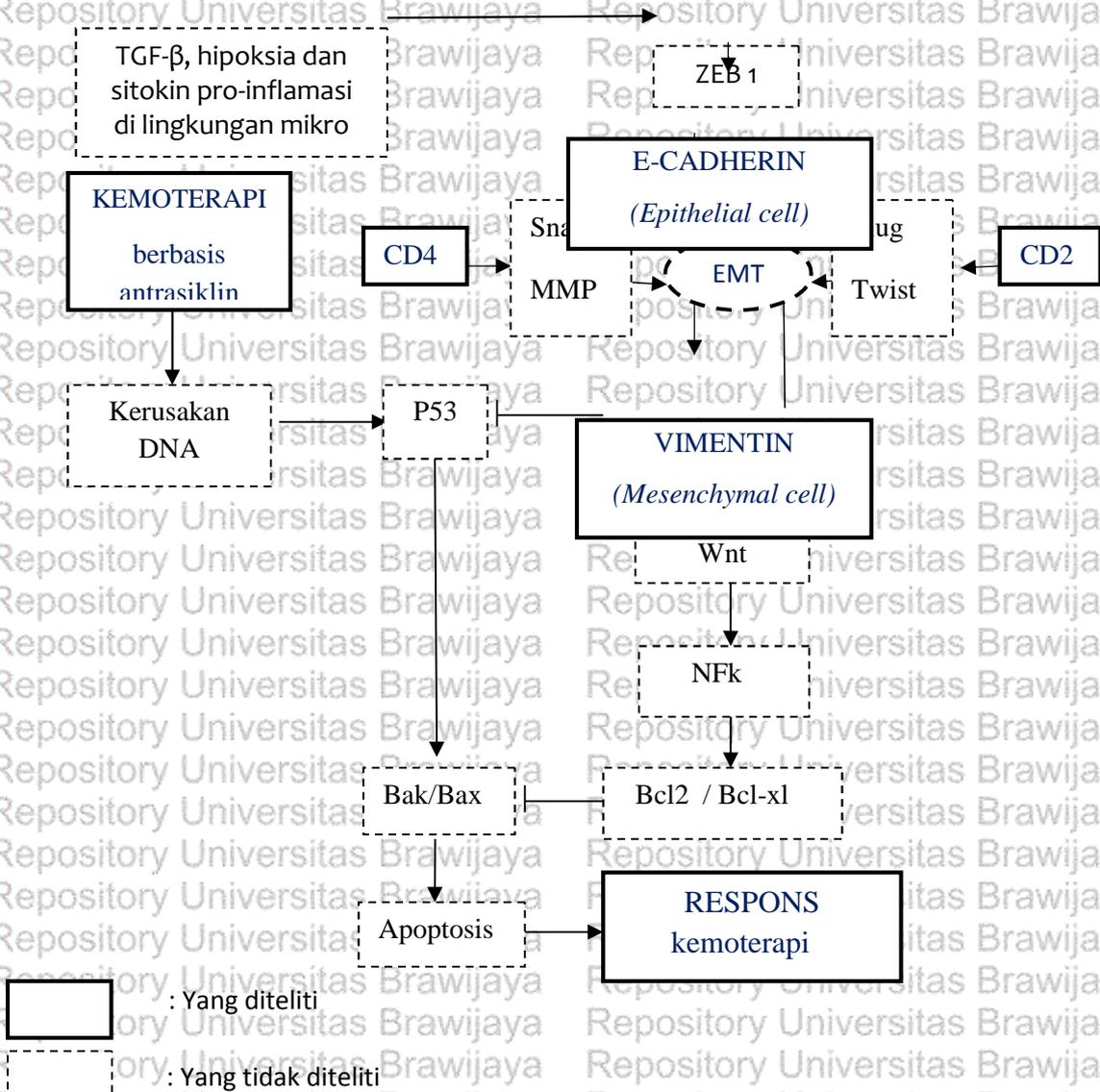
Berbagai jenis sitokin proinflamasi akan menyebabkan fosforilasi kompleks STAT 3 dan NFkB (Rel A) di membran sel, fosforilasi tersebut akan menyebabkan STAT 3 translokasi ke nukleus untuk mengaktifkan berbagai ekspresi gen seperti Spingosine 1 Phosphate (S1P) yang akan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi, *Twist signaling* yang menyebabkan blokade ekspresi CD24 dan E-cadherin, *Snail signaling* yang meningkatkan ekspresi Vimentin dan aktivasi gen ZEB dimana ZEB bersama dengan gen hTERT akan meningkatkan ekspresi dari CD44. Selain penekanan dari ekspresi E-cadherin, peningkatan ekspresi CD44 akan menyebabkan fosforilasi kompleks β -catenin dan E-cadherin sehingga menyebabkan translokasi β -catenin ke nukleus yang juga akan menyebabkan stabilisasi ekspresi CD44. Pada sebuah penelitian pada kanker payudara didapatkan ekspresi CD44 dan CD24 terdeteksi pada cairan efusi pleura metastasis. Sebaliknya peningkatan jumlah CD24 telah teridentifikasi pada sel kanker metastasis pasien kanker payudara. Karena itu sangat mungkin CD44 dan CD24 pada sel-sel kanker payudara inilah yang menginisiasi proses metastasis (Shmelkov *et al.*, 2008).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka konsep penelitian

Berdasarkan penelusuran teori dan konsep yang telah dilakukan di Bab Tinjauan Pustaka, maka dapat disusun kerangka konsep seperti gambar di bawah ini.



Gambar 3.1. Kerangka Konsep

Keterangan kerangka konsep

Kanker payudara berasal dari sel-sel epitel yang kemudian berubah menjadi sel mesenkim karena proses EMT. Pada kondisi tertentu terjadi peningkatan aktivasi *signalling*



cell melalui Wnt dan TGF maka akan terjadi transisi sel epitel menjadi sel mesenkim yang dikenal dengan istilah *Epithelial Mesenchymal Transition*. Pada kondisi ini terjadi penurunan E-cadherin dan peningkatan ekspresi glikoprotein Vimentin yang terdapat pada *basement* membran sel yang termasuk dalam komponen *Ekstra Celullar Matrix* (ECM). Protein CD44 pada permukaan membran sel juga akan memberikan sinyal transduksi yang akan merangsang Snail dan MMT1-MMP yang selanjutnya akan memicu terjadinya EMT. Sedangkan CD24 mengaktifasi EMT melalui jalur aktivasi Snail, Slug dan Twist. Vimentin akan berikatan dengan reseptor yang terdapat pada permukaan sel dan mempengaruhi *molecule adhesion* sel-sel lainnya. Ikatan ini dapat meneruskan sinyal yang berasal dari matriks ekstraseluler yang berakibat sinyal *survival* dilepaskan ke sitoplasma. Ikatan ligand Vimentin dengan reseptor yang ada pada permukaan membran sel dapat mengaktifasi jaras sinyal intrasel yang salah satunya adalah *signalling* ERK (*extracellular signal-regulated kinases*). *Signaling* ini masuk ke dalam nukleus sel dan memicu faktor transkripsi yaitu NFkB. NfKB merupakan faktor transkripsi yang dapat merangsang ekspresi gen-gen spesifik yang menyandi protein yang berperan penting dalam siklus sel, diantaranya adalah protein anti apoptosis Bcl-2, Bcl-xl, dan protein pro-proliferasi yaitu Myc, dimana kemoterapi antrasiklin menyebabkan kerusakan DNA dan memicu ekspresi p-53, kemudian p-53 menginduksi ekspresi protein pro apoptosis seperti Bak/Bax (Kresno, 2012). Bcl-2 dan Bcl-xl yang meningkat dapat menghambat protein Bax yang dipicu oleh kemoterapi sehingga apoptosis yang diharapkan tidak terjadi. Apoptosis yang menurun memberikan pengaruh terhadap respons kemoterapi pasien kanker payudara dan akan menyebabkan respons kemoterapi menurun (Lo and Yu-Li, 2012). Masing-masing protein prediktor mempunyai pengaruh langsung terhadap EMT maupun terhadap respons kemoterapi, namun diketahui juga bahwa di antara masing-masing protein prediktor satu dengan protein prediktor lainnya mempunyai interaksi genetik (Ashworth et al., 2011) yang akan mengubah pengaruh keseluruhan protein terhadap proses EMT, migrasi, metastasis, apoptosis dan respons kemoterapi.



3.2. Hipotesis penelitian

Kombinasi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat digunakan sebagai satu model prediktor respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal, oleh karena itu hipotesis penelitian ini adalah:

1. Terdapat hubungan antara ekspresi Vimentin yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium III subtipe Luminal.
2. Terdapat hubungan antara ekspresi E-cadherin yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal.
3. Terdapat hubungan antara ekspresi CD44 yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal.
4. Terdapat hubungan antara ekspresi CD24 yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal.
5. Kombinasi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dapat digunakan sebagai satu model yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah untuk memprediksi respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *experimental* dengan jenis penelitian *pre-experimental*. Menurut Zainuddin (2011), *eksperimental* adalah suatu penelitian hubungan sebab akibat yang dilakukan terhadap kejadian/fenomena yang terjadi akibat adanya intervensi dari peneliti. Pada penelitian *eksperimental* persoalan pokok penelitian adalah kejadian yang akan terjadi akibat adanya intervensi (*treatment*) oleh peneliti. Salah satu jenis *eksperimental* adalah *pre-experimental* yaitu rancangan *eksperimental* yang tidak memenuhi tiga syarat, syarat yang tidak dapat terpenuhi antara lain tidak ada kelompok kontrol dan tidak menggunakan sampel random.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah *one group pretest-post test design* yang merupakan salah satu jenis *pre-experimental*, dimana penelitian hanya menggunakan satu kelompok perlakuan dan diamati sebelum dan sesudah perlakuan yang terjadi akibat adanya intervensi dari peneliti (Zainudin, 2011). Perlakuan dari penelitian ini adalah pemberian kemoterapi neoajuvan. Penelitian ini merupakan penelitian *invivo* pada pasien kanker payudara. Kanker payudara yang dilakukan penelitian adalah stadium IIIB. Dipilihnya kanker payudara stadium IIIB mengingat pada stadium ini terapi standarnya adalah pemberian kemoterapi neoajuvan, dimana penilaian respons kemoterapi dapat diukur dari perubahan ukuran dan kondisi tumor secara *invivo* langsung pada tubuh pasien.

Penelitian ini mengukur *variable* klinis ukuran klinis tumor sebelum pemberian kemoterapi neoajuvan pada jaringan kanker payudara hasil biopsi pasien kanker payudara stadium lanjut lokal IIIB subtipe Luminal serta variabel biomolekuler berupa ekspresi Vimentin, E-cadherin CD44 dan CD24 dari jaringan kanker payudara sebelum pelaksanaan kemoterapi. Jadi perlakuan dalam penelitian ini adalah kemoterapi yang diberikan oleh peneliti langsung terhadap sampel penelitian yang dilakukan sebanyak 3 kali perlakuan.

Hasil respons kemoterapi dianalisis dan dihubungkan dengan hasil ekspresi E-cadherin, Vimentin, CD44 dan CD24. Dari hasil korelasi dianalisis dan dibuat pemodelan untuk





menentukan kemampuan biomarker sebagai prediktor respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal di RSUD dr.

Saiful Anwar Malang.

4.2. Lokasi dan waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi

Pengambilan sampel dari subjek penelitian dilakukan di Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar Malang. Persiapan, pemeriksaan dan analisis imunohistokimia Vimentin, E-cadherin CD44 dan CD24 yang dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Dipilihnya fasilitas di kedua tempat tersebut karena kedua institusi tersebut sangat memadai, lengkap dan bisa dijangkau oleh peneliti.

4.2.2 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan selama 22 minggu, Januari 2017 hingga Juli 2017.

4.3. Populasi penelitian

Subyek dalam penelitian ini adalah pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal, hal ini dikarenakan kelompok tersebut yang paling banyak ditemukan (lebih kurang 55%) di RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

Tabel 4.1 Klasifikasi kanker payudara berdasarkan molekular sub tipe

	Prevalensi	Kecenderungan	Prognosis
Basal like	15 – 20%	ER/PR/HER2 negatif	Buruk
HER2+	10 – 15%	ER (-), PR (-), HER2 (+)	Buruk
Luminal A	40%	ER dan atau PR (+), HER2 (-) low	



3) Skala Performance Karnofsky > 70%

4.4.2. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi yang ditetapkan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Terdapat morbiditas lain yang merupakan kontraindikasi pemberian kemoterapi, seperti kelainan jantung kongestif, riwayat serangan jantung akut (*acute myocardial infarction*), penyakit hati kronis, gangguan fungsi ginjal kronis
- 2) Penderita pernah menjalani pembedahan, mendapatkan pengobatan dengan kemoterapi yang lain sebelumnya atau pemberian terapi hormonal.

4.4.3 Kriteria drop out

Penderita yang tidak dapat menyelesaikan pemberian kemoterapi neoajuvan sebanyak 3 seri, baik karena efek samping yang berat atau atas permintaan pasien sendiri.

4.5. Besar sampel

Ukuran sampel dihitung berdasarkan rumus (Dahlan, 2009), sebagaimana di bawah.

$$n = \left\lceil \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S_{gab}^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} \right\rceil$$

Keterangan:

$$S_{gab}^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Kelompok I: mean = $\bar{X}_1 = 12,29$ SD1 = 4,5

Kelompok II: mean = $\bar{X}_2 = 14,66$ SD2 = 3,28

Taraf signifikansi $\alpha = 0,05$ $Z_{\alpha} = 1,960$ (2 pihak)

Kekuatan uji: $1 - \beta = 80\%$ $\beta = 20\%$ $Z_{\beta} = 1,282$ (2 pihak)



$$\text{Rumus: } n = \left[\frac{(z_{\alpha} + z_{\beta}) S_{gab}}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)} \right]^2$$

$$S_{gab}^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \left[\frac{(30-1)(4,5)^2 + (30-1)(3,28)^2}{(30+30-2)} \right] = 15,5042$$

$$n = \left[\frac{(1,960 + 1,282)^2 (15,5042)}{(12,29 - 14,66)^2} \right] = 34,01207$$

dibulatkan ke atas maka diperoleh 35, jadi dalam penelitian ini ukuran sampel yang digunakan adalah 35 orang.

4.6. Cara pengambilan sampel

Sampel diambil dengan cara *consecutive sampling* sesuai kriteria inklusi dan eksklusi.

4.7. Variabel penelitian

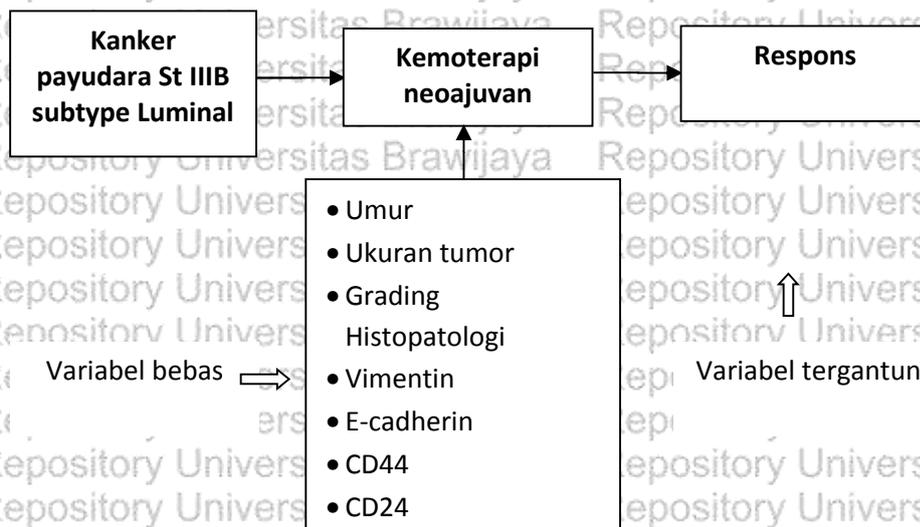
A. Variabel bebas:

1. Umur
2. Ukuran tumor
3. Grading histopatologis
4. Ekspresi Vimentin
5. Ekspresi E-cadherin
6. Ekspresi CD44
7. Ekspresi CD24

B. Variabel tergantung: respons kemoterapi, datanya bersifat kategorik ada dua yaitu kelompok respons dan kelompok tidak respons.



Hubungan antar variabel di atas dapat digambarkan dalam bagan di bawah ini:



Gambar 4.1.

Bagan hubungan antar variabel

4.8. Definisi operasional

Parameter yang akan diukur dalam penelitian ini adalah penanda *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) yang akan dilihat ekspresinya sebelum dilakukan kemoterapi melalui pemeriksaan imunohistokimia jaringan kanker payudara dari hasil prosedur biopsi yang sudah menjadi prosedur tetap di rumah sakit sehingga peneliti bisa memanfaatkan jaringan yang didapat tanpa menambah prosedur pengambilan jaringan diluar prosedur.

Penanda yang diukur dengan pemeriksaan imunohistokimia adalah ekspresi E-cadherin, ekspresi Vimentin, ekspresi ekspresi CD44 dan ekspresi CD24 di jaringan biopsi tumor primer dan kemudian semua marker penanda dibandingkan dengan respons kemoterapi.



1. Kanker payudara adalah kanker payudara stadium IIIB yang memenuhi kriteria stadium lanjut lokal menurut UICC/AJCC 2009 dan secara histopatologis adalah *Carcinoma* (Benson, 2010) dan yang termasuk sub tipe Luminal (Blows et al., 2010).
2. Pemeriksaan imunohistokimia (IHK) kelima protein parameter Vimentin, E-cadherin, CD44, CD24 diambil dari jaringan kanker payudara hasil biopsi insisi sebelum diberikan kemoterapi neoajuvan.
3. E-cadherin adalah suatu protein yang berada di membran sel yang merupakan penanda sel epitel yang akan diamati ekspresinya betwarna coklat di permukaan sel yang diidentifikasi dengan menggunakan *E-cadherin (EP700Y) rabbit monoclonal primary antibody* yang dibeli dari Rabmab *technology* dari Abcam dengan pemeriksaan imunohistokimia jaringan tumor, diukur secara kuantitatif dengan nilai persen, ekspresi pada kanker payudara diprediksi berhubungan dengan respons yang baik terhadap kemoterapi.
4. Vimentin adalah suatu protein yang hanya akan diekpresi pada saat aktifasi EMT dan merupakan penanda fenotif sel mesenkim, yang akan diamati ekspresinya berwarna coklat di permukaan sel yang diidentifikasi dengan menggunakan *Vimentin (V9) mouse monoclonal antibody* dari *sigma-aldrich company* dari pemeriksaan imunohistokimia jaringan tumor, diukur secara kuantitatif dengan nilai persen, ekspresinya diprediksi berhubungan dengan respons yang buruk (tidak respons) terhadap kemoterapi.
5. CD44 adalah ekpresi populasi protein yang mengindikasikan adanya pertumbuhan yang melambat dari sel dan meningkatkan risiko kemoresistensi yang ekspresinya diamati dari jaringan tumor, dihitung populasi dengan melihat ekspresinya berwarna coklat di permukaan sel yang diidentifikasi dengan menggunakan *antibody double staining* dengan *CD44 (MRQ-13) mouse monoclonal antibody-rabbit policlonal anti-CD44 antibody ab199140 abcam* melalui analisis histokimia dan diukur secara kuantitatif dengan nilai persen, ekspresinya pada kanker payudara diprediksi berhubungan dengan respons buruk (tidak respons) terhadap kemoterapi.



6. CD24 adalah ekspresi populasi protein yang mengindikasikan potensi resistensi kemoterapi yang ekspresinya diamati dari biopsi jaringan tumor sebelum kemoterapi neoajuvan, dihitung populasi dengan melihat ekspresinya berwarna coklat permukaan sel kanker dengan menggunakan *rabbit polyclonal anti-CD24 antibody ab199140 abcam* melalui analisis histokimia dan diukur secara kuantitatif dengan nilai persen, ekspresinya pada kanker payudara diprediksi berhubungan dengan respons terhadap kemoterapi.

7. Ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dinilai dari kuantitas *immunostaining*, yang dikelompokkan berdasarkan reaksi pewarnaan positif dan negatif, kemudian sel yang positif di hitung per 100 sel di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x (Bircan *et al.*, 2006; Honeth, 2008).

8. Kemoterapi neoajuvan adalah pemberian obat anti kanker kombinasi berbasis antrasiklin yang diberikan sebelum pembedahan (Kaufman *et al.*, 2006), diberikan sebanyak 3 siklus.

9. Respons kemoterapi dikelompokkan menjadi dua, yaitu respon dan tidak respons, dengan mengacu pada standar *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST), sebagai berikut:

1. RESPONS, terdiri dari:

1. *Complete response* adalah keadaan dimana tumor payudara sesudah pemberian kemoterapi kombinasi neoajuvan berbasis antrasiklin sebanyak 3 seri secara klinis tumor primer menghilang.

2. *Partial response* adalah keadaan dimana ukuran tumor sesudah pemberian kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin sebanyak 3 seri menunjukkan pengecilan tumor primer lebih dari 30%.

2. TIDAK RESPONS, terdiri dari:



1. *Stable disease* adalah keadaan dimana tumor payudara sesudah pemberian kemoterapi kombinasi neoajuvan berbasis antrasiklin sebanyak 3 seri, tumor primer mengecil kurang dari 30% dari membesar kurang dari 20%

2. *Progressive disease* adalah keadaan dimana tumor payudara sesudah diberikan kemoterapi kombinasi neoajuvan berbasis antrasiklin sebanyak 3 seri membesar lebih dari 20% atau tumbuh tumor baru di tempat lain (Bogaerts *et al.*, 2009).

4.9. Prosedur pemeriksaan

4.9.1. Bahan pemeriksaan imunohistokimia (IHC)

Dibutuhkan jaringan tumor payudara yang telah difiksasi dengan *buffer* formalin 10%, selambat-lambatnya 30 menit sesudah spesimen diambil dan selambat-lambatnya 48 jam spesimen sudah diproses dalam bentuk blok parafin.

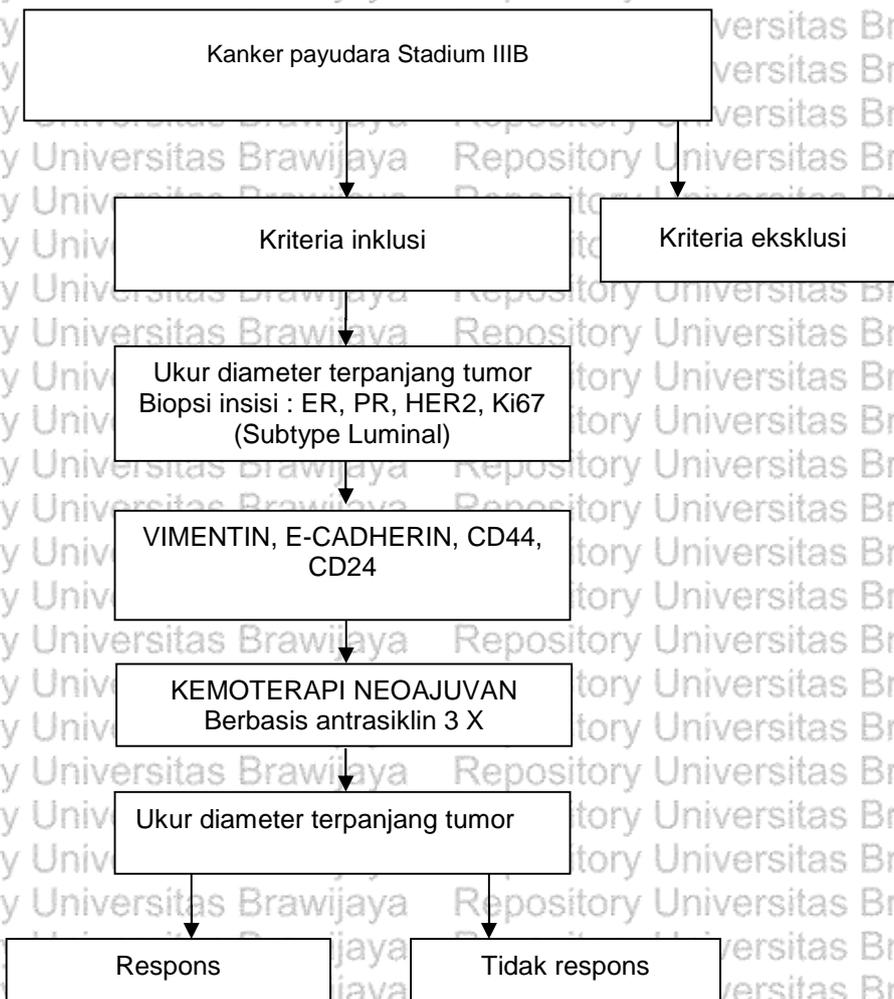
4.9.2. Cara pemeriksaan imunohistokimia (IHC)

Sebelum pemeriksaan atau pengecatan imunohistokimia (IHC), spesimen jaringan yang akan diperiksa harus difiksasi terlebih dahulu dengan tujuan untuk mencegah autolisis, mempertahankan antigenitas jaringan, memperkuat indeks refraksi dari bagian-bagian jaringan, dan memperkuat elemen sel terhadap proses pengecatan jaringan. Proses berikutnya meliputi dehidrasi jaringan, menghilangkan atau membersihkan jaringan dari agen dehidrasi, infiltrasi oleh media/bahan *embedding*, dan pemotongan/pengirisan jaringan untuk dicat dengan antibodi. Fiksasi dipergunakan adalah *buffered formalin 10%*. Pengecatan tergantung dari masing-masing produk *kit* antibodi monoklonal. Produk *kit* antibodi ini, sebelum dipergunakan harus disimpan dalam suhu kamar antara 20⁰ – 25⁰C dan harus selalu dikalibrasi. Suhu kamar juga harus dipertahankan selama proses pengecatan dilaksanakan. Demikian juga gelas obyek tetap dalam kondisi basah dan tidak boleh kering selama proses pengecatan. Kekeringan dapat menyebabkan peningkatan *non specific staining*, dan dapat menimbulkan interpretasi berbeda.



4.10 Alur penelitian

Untuk memperjelas dan mempermudah penelitian ini maka dibuat alur penelitian seperti pada gambar di bawah ini.



Gambar 4.2. Alur penelitian

4.11 Pelaksanaan penelitian

7.11.1. Penerbitan ethical clearance

Penerbitan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

7.11.2. Proses seleksi subyek penelitian

Subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian ini diseleksi dari instalasi rawat jalan dan rawat inap Subdivisi Bedah Onkologi Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang.

7.11.3. Proses imunohistokimia

Pemeriksaan terhadap Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 adalah dengan menggunakan IHK (imunohistokimia) yang sudah diperdagangkan dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap protein yang diidentifikasi.

7.11.4. Proses penilaian respons Klinis

Proses penilaian respons klinis dievaluasi berdasarkan *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)* (Bogaerts *et al.*, 2009), dengan cara membandingkan ukuran tumor sebelum dan sesudah diberikan kemoterapi neoajuvan.

Cara pengukuran diameter tumor:

1. Tumor payudara sebelum kemoterapi ditentukan lokasinya dan digambar pada permukaan kulit payudara, kemudian diukur diameter terpanjang tumor dan dicatat.
2. Sesudah kemoterapi neoajuvan 3 kali, ukuran diameter terpanjang tumor diukur kembali dengan cara yang sama dan dicatat.
3. Tingkat respons tumor diukur dengan membandingkan ukuran awal dengan ukuran tumor sesudah kemoterapi neoajuvan 3 kali, kemudian ditentukan responnya.



Tabel 4.2. Respons kemoterapi

Jenis respons	Tumor mengecil	Obyektif
A. Respons		
Respons komplrit	Menghilang	Menghilang
Respons parsial	Mengecil > 30%	Tersisa < 70%
B. Tidak respons		
Stabil/ tetap	Mengecil < 30%	Membesar < 20%
Progresif	Membesar > 20%	Membesar > 20%

Sumber: Bogaerts *et al.*, (2009).

4.12 Analisis data

Analisis data dilakukan dengan metode statistika, seperti pada uraian berikut.

1) Pengujian hipotesis 1, 2, 3 dan 4

Pengujian hipotesis 1, 2, 3 dan 4 menggunakan analisis *Chi-square* untuk melihat hubungan variabel bebas yang meliputi ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 pada jaringan kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal dengan respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin. Penggunaan analisis *Chi-square* dengan pertimbangan bahwa variabel respons kemoterapi neoajuan memilik data kategori dengan skala nominal, yaitu skor 1 = tidak respons dan 2 = respons.

2) Pengujian hipotesis 5

Pengujian hipotesis 5 menggunakan analisis diskriminan yaitu permodelan statistika dengan variabel tergantung yang memiliki data kategorik (skor 1 = tidak respons dan 2 =



respons). Pertimbangan digunakan analisis diskriminan mengingat model yang dianalisis adalah dengan variabel prediktor/variabel bebas, yaitu $X_1 = \text{Vimentin}$, $X_2 = \text{E-cadherin}$, $X_3 = \text{CD44}$ dan $X_4 = \text{CD24}$ memiliki data numerik (kuantitatif), sedangkan variabel tergantung $Y = \text{respons kemoterapi}$, memiliki data kategorik (skor 1 = tidak respons dan 2 = respons).

Analisis ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi prediktor sebagai pembeda (berpengaruh) paling kuat terhadap respons kemoterapi neoajuvan pada kanker payudara stadium III B sub tipe Luminal. Di samping itu, model atau fungsi diskriminan juga dapat digunakan untuk melakukan prediksi respons kemoterapi neoajuvan pada kanker payudara stadium III B sub tipe Luminal berdasarkan pemeriksaan Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24.

(1) Model atau Fungsi Diskriminan

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \epsilon$$

Di mana:

$Y = \text{Respons kemoterapi}$ (skor 1 = tidak respons dan 2 = respons)

$X_1 = \text{Vimentin}$, $X_2 = \text{E-cadherin}$, $X_3 = \text{CD44}$ dan $X_4 = \text{CD24}$

$\beta_i = \text{Koefisien fungsi diskriminan}$

$\epsilon = \text{error}$

(2) Asumsi Analisis Diskriminan

- Terdapat perbedaan yang signifikan dari variabel X antar kategori variabel Y (uji dengan MANOVA).
- Variabel X berdistribusi normal (ganda).
- Homokedastisitas.

(3) Evaluasi Fungsi Diskriminan

- Uji signifikansi dengan Bartlett test (Chi Square)
- Peranan relatif: besarnya peranan fungsi bersangkutan relatif terhadap keseluruhan fungsi
- Korelasi kanonik: Korelasi antara skor diskriminan (Y_i duga) dengan Y (observasi). Kuadrat dari korelasi kanonik mirip dengan koefisien determinasi (R^2) pada analisis regresi

(d) Akurasi model dapat dilihat dari Hit ratio

(4) Evaluasi Fungsi Diskriminan

Variabel X dengan koefisien pada fungsi diskriminan standardize semakin besar berarti merupakan pembeda/berpengaruh kuat

$$Z_Y = p_1 Z_{X1} + p_2 Z_{X2} + p_3 Z_{X3} + p_3 Z_{X3}$$

Nilai p_i paling besar, berarti variabel tersebut merupakan pembeda atau berpengaruh paling kuat.

(5) Prediksi dengan Fungsi Diskriminan

Prediksi atau pengelompokan menggunakan Metode Fisher, yaitu alokasikan atau prediksi P (pasien atau individu yang akan dikelompokan) ke dalam kelompok (kategori) ke k , jika:

$$\sum_{m=1}^r (Y_m - \bar{Y}_{km})^2 \leq \sum_{m=1}^r (Y_m - \bar{Y}_{hm})^2$$

Dimana: - $k \neq h$

- Y_m = skor diskriminan individu yang dikelompokan

- \bar{Y}_{km} = centroid fungsi ke m kategori ke k

Atau alokasikan atau prediksi pasien atau individu ke dalam kelompokkan k_1 jika skor diskriminan fungsi ke 1 lebih besar dari skor diskriminan fungsi lainnya. Proses perhitungan dilakukan dengan bantuan software statistika SPSS.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Karakteristik pasien partisipan

Partisipan dalam penelitian ini adalah pasien di rumah sakit dr. Saiful Anwar Malang bulan Januari 2017 hingga Juli 2017 sebanyak 35 orang yang didiagnosis kanker payudara stadium IIIB sub type Luminal yang menjalani kemoterapi neoajuvan sebelum operasi. Adapun sebaran data karakteristik partisipan dijelaskan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1. Karakteristik pasien partisipan

Variabel	Rerata±SD	Frekuensi	Persen (%)
Usia pasien (tahun)	49.51±5.28	-	-
Grading			
1		4	11.42
2		15	42.85
3		16	45.71
Ukuran tumor (cm):			
Sebelum terapi	8.51±5.86	-	-
Sesudah terapi	3.23±2.55	-	-
Kelenjar getah bening:			
Tidak ada		8	22.86
Ada positif		20	57.14
Ada multiple		5	14.29
Ada infraklafikular		2	5.71
Estrogen reseptor (+)		35	100
Progesteron reseptor (+)		35	100
HER2 :			
- (negatif)		8	22.86
+ (negatif)		20	57.14
++ (negatif)		5	14.29
+++ (positif)		2	5.71
Ki67:			
Tinggi		28	80
Rendah		7	20
Vimentin (%)	30.63±16.02	-	-
E-cadherin (%)	48.89±27.79	-	-
CD 44(%)	35.48±18.80	-	-
CD24 (%)	46.57±28.03	-	-

Tabel 5.1 menjelaskan sebaran data usia pasien partisipan dalam penelitian ini rata-rata berumur 49.51 tahun dengan rentang usia antara 44 tahun hingga 55 tahun. Tampak bahwa pasien partisipan dengan kasus kanker payudara ini sebagian besar berusia di atas



40 tahun. Dari sebaran data pasien partisipan berdasarkan grading tumor, yang termasuk dalam kategori grade I sebanyak 4 pasien (11.42%), grade II sebanyak 15 pasien (42.85%) dan 45.71% (16 pasien) termasuk dalam kategori grade III. Sedangkan untuk data ukuran tumor sebelum operasi rata-rata 8.51 cm dengan rentang ukuran tumor berkisar antara 2.65 cm sampai dengan 14.37 cm. Sedangkan ukuran tumor sesudah menjalani kemoterapi menjadi rata-rata berukuran 3.23 cm dengan rentang ukuran tumor antara 0.68 cm sampai 5.78 cm. Hal ini berarti bahwa secara umum terjadi penurunan ukuran tumor setelah pasien menjalani kemoterapi neoajuvan sebanyak 3 kali.

Pemeriksaan metastasis kelenjar getah bening pada semua partisipan ternyata ditemukan antara lain tidak ditemukan penyebaran pada kelenjar getah bening ada 8 orang (22.86%), sedangkan yang didapatkan adanya penyebaran pada kelenjar getah bening sebanyak 20 orang (57.14%). Yang termasuk kategori penyebaran kelenjar getah bening multipel ada 5 orang (14.29%) dan paling sedikit pada kategori penyebaran infraklavikular sebanyak 2 orang (5.71%).

Keseluruhan pasien partisipan yaitu 35 orang (100%) adalah subtype Luminal dengan hasil menunjukkan hasil pemeriksaan imunohistokimia estrogen reseptor/ER(+) dan atau progesteron reseptor/PR(+). Sedangkan untuk hasil pemeriksaan HER2(-) sejumlah 8 orang (22.86%), HER2(+1) sejumlah 20 pasien partisipan (57.14%), HER2 (+2) sejumlah 5 pasien partisipan (14.29%) dan 2 pasien partisipan (5.71%) termasuk dalam kategori HER2(+3). Selanjutnya pemeriksaan terhadap Ki67, 28 pasien partisipan (80%) menunjukkan ekspresi Ki67 tinggi dan ekspresi Ki67 rendah ditemukan pada 7 pasien partisipan (20%).

Sedangkan ekspresi Vimentin sebelum menjalani kemoterapi menunjukkan rata-rata 30.63 dengan kisaran antara 14.61 sampai 46.65. Sedangkan ekspresi E-cadherin sebelum menjalani kemoterapi menunjukkan rata-rata 48.89 dengan kisaran antara 21.1 sampai 76.68. Nilai rata-rata CD44 sebelum menjalani kemoterapi 35.48 dengan sebaran data kisaran 16.68 sampai dengan 54.29 dan untuk rerata jumlah sel yang mengekspresikan marker CD24 adalah 46.57 dengan rentang sebaran data pada kisaran 18.53 sampai 74.61.



5.2. Analisis uji asumsi

Data penelitian ini berskala rasio yaitu usia sampel, Vimentin, E-cadherin, CD44, dan CD24 dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada hasil analisis uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dijelaskan secara lengkap tampak pada Tabel 5.2 di bawah ini.

Tabel 5.2. Hasil uji normalitas data

Variabel pengamatan	p-value		Distribusi
	Ada respons (n=19)	Tidak ada respons (n=16)	
Usia sampel (tahun)	0.516	0.666	Normal
Vimentin (%)	0.391	0.509	Normal
E-cadherin	0.423	0.667	Normal
CD44	0.559	0.428	Normal
CD24	0.135	0.080	normal

Keterangan: Jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti data tidak terdistribusi normal dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti data terdistribusi normal.

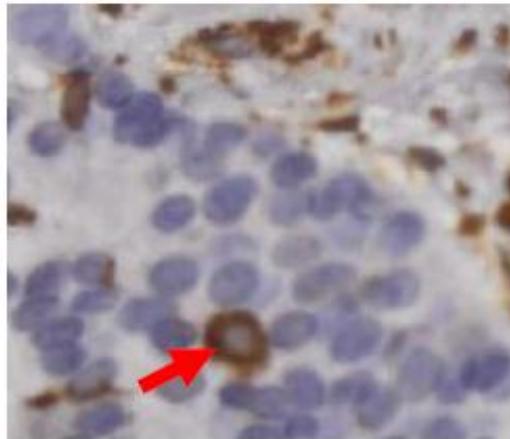
Tabel 5.2 menjelaskan bahwa berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk* diperoleh data usia sampel, Vimentin, E-cadherin, CD44, dan CD24 untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai $p\text{-value}$ yang semuanya lebih besar dari angka signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti terdistribusi normal. Selanjutnya data dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

5.3. Statistik diskriptif data penelitian

5.3.1. Ekspresi Vimentin

Dalam penelitian ini partisipan adalah semua pasien penderita kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal yang berada di rumah sakit dr. Saiful Anwar Malang bulan Januari 2017 hingga Juli 2017. Adapun hasil pemeriksaan imunohistokimia Vimentin pada

jaringan kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal sebelum pasien menjalani kemoterapi neoajuvan ditunjukkan pada gambar di bawah ini.



Keterangan Hasil positif imunohistokimia ditandai dengan *membranous staining* berwarna coklat melingkari sel kanker dengan pembesaran 400x.

Gambar 5.1. Ekspresi Vimentin pada jaringan kanker payudara

Gambar 5.1 memperlihatkan ekspresi Vimentin yang diamati pada jaringan kanker payudara dari pasien kasus penderita kanker payudara tipe Luminal stadium IIIB sebelum mendapatkan kemoterapi neoajuvan yang berada di rumah sakit dr. Saiful Anwar Malang.

Jaringan kanker tersebut diperiksa dengan pemeriksaan imunohistokimia, hasil pemeriksaan menunjukkan hasil yang positif dan pada gambar diperlihatkan dengan *membranous staining* yang berwarna coklat melingkari sel kanker dengan pembesaran 400x yang ditunjukkan dengan tanda anak panah berwarna merah pada Gambar 5.1. Adapun dari hasil pemeriksaan Vimentin diperoleh data yang tersebar ditunjukkan pada tabel di bawah.

Tabel 5.3. Ekspresi Vimentin jaringan kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal

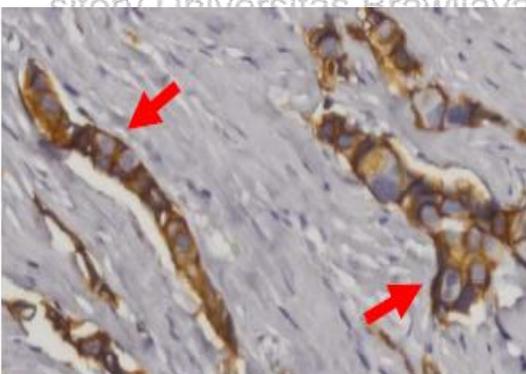
Kelompok	n	Rerata (%)	Selang kepercayaan 95%		p-value t-test
			Batas bawah (%)	Batas atas (%)	
Respons	19	18.68	9.57	27.79	0.000
Tidak respons	16	44.81	35.51	54.11	

Tampak pada Tabel 5.3 bahwa dari pasien partisipan kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal yang kelompok respons terhadap kemoterapi neoajuan sebanyak 19 pasien dengan rerata Vimentin 18.68% dan tersebar disekitar 9.57% - 27.79%. Hal ini berarti bahwa apabila pasien kanker payudara kelompok respons terhadap kemoterapi neoajuan 3 kali maka akan menunjukkan ekspresi Vimentin yang lebih rendah dibandingkan kelompok tidak respons hal ini dibuktikan dengan nilai signifikansi 0.000 yang berarti terdapat perbedaan ekspresi Vimentin pada dua kelompok pengamatan berdasarkan respons kemoterapi. Sedangkan pasien kanker payudara yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuan sebanyak 16 orang pasien dengan rerata 44.81% dan tersebar disekitar 35.51% - 54.11%. Dengan kata lain pasien partisipan yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuan 3 kali maka akan menunjukkan ekspresi Vimentin yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan pasien partisipan kelompok respons.

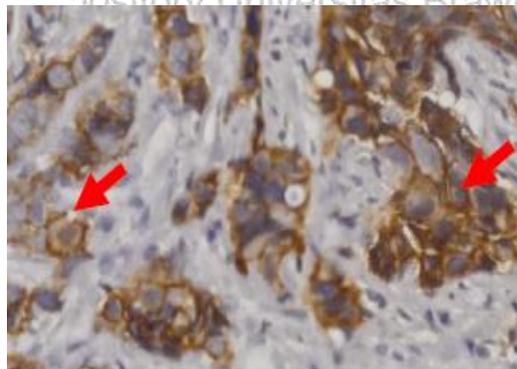
5.3.2. Ekspresi E-cadherin

Berikut disajikan gambaran imunohistokimia E-cadherin dari potongan jaringan biopsi kanker payudara sebelum diberikan kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin yang distaining dengan antibodi E-cadherin untuk dianalisis ekspresinya per seratus sel pengamatan mikroskop dengan pembesaran 400x.

A



B



Keterangan: Gambar A dan B menunjukkan hasil positif *immunoreactivity* yang ditandai dengan *membranous staining* berwarna coklat melingkari sel kanker.

Gambar 5.2. Ekspresi E-cadherin pada jaringan kanker payudara

Gambar 5.2 memperlihatkan ekspresi E-cadherin yang diamati pada jaringan kanker payudara dari pasien stadium IIIB sub tipe Luminal sebelum mendapatkan kemoterapi neoajuvan di RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Jaringan kanker tersebut dilihat dengan pemeriksaan imunohistokimia, hasil pemeriksaan menunjukkan hasil yang positif pada gambar diperlihatkan dengan *membranous staining* yang berwarna coklat melingkari sel kanker dengan pembesaran 400x yang ditunjukkan dengan ditandai anak panah berwarna merah pada Gambar 5.2 bagian A maupun bagian B.

Adapun hasil pemeriksaan E-cadherin diperoleh data yang tersebar ditunjukkan pada tabel di bawah.

Tabel 5.4. Ekspresi E-cadherin jaringan kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal

Kelompok	n	Rerata	Selang kepercayaan 95%		p-value t-test
			Batas bawah	Batas atas	
Respons	19	69.16	48.75	89.57	0.000
Tidak respons	16	24.81	14.24	35.38	

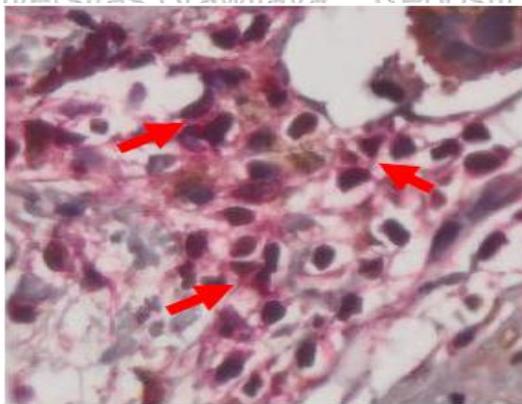
Tampak pada Tabel 5.4 bahwa pada kelompok sampel pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal yang respons terhadap kemoterapi neoajuvan sebanyak 19 orang pasien dengan rerata E-cadherin 69.16 dan tersebar disekitar 48.75 – 89.57. Hal ini berarti bahwa apabila pasien kanker payudara yang termasuk kelompok respons terhadap kemoterapi neoajuvan maka akan menunjukkan ekspresi E-cadherin yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tidak respons. Sedangkan pasien kanker payudara yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan sebanyak 16 orang pasien dengan rerata E-cadherin 24.81 dan tersebar disekitar 14.24 – 35.38. Hal ini berarti bahwa apabila pasien kanker payudara tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan akan menunjukkan ekspresi E-cadherin yang lebih rendah bila dibandingkan dengan yang respons. Pernyataan tersebut divalidasi dengan hasil analisis uji beda dua kelompok pengamatan pasca kemoterapi



terkait ekspresi E-cadherin sebelum pemberian kemoterapi neoajuvan 3 siklus menunjukkan p-value 0.000 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi E-cadherin yang bermakna pada dua kelompok pengamatan respons kemoterapi neoajuvan pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal.

5.3.3. Ekspresi CD44

Berikut hasil hitung sel dari jaringan kanker payudara pasien partisipan stadium IIIB sub tipe Luminal dengan staining anti CD44. Jaringan kanker diamati dengan pemeriksaan imunohistokimia, setelah jaringan sebelumnya diproses dalam bentuk blok parafin sehingga didapatkan irisan jaringan untuk proses pengamatan imunohistokimia di mikroskop di Laboratorim Patologi Anatomi FK Universitas Brawijaya/RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Adapun hasil pemeriksaan menunjukkan CD44 positif dengan mikroskop pembesaran 400x di dapatkan gambaran *membranous staining* yang berwarna coklat pada sel kanker, yang visualisasinya ditunjukkan dengan tanda anak panah seperti gambar di bawah ini.



Keterangan: Hasil CD44 positif imunohistokimia ditandai dengan *membranous staining* berwarna coklat pada sel kanker.

Gambar 5.3. Ekspresi CD44 pada jaringan kanker payudara

Pada Gambar 5.3 memperlihatkan ekspresi CD44 yang diamati dengan pemeriksaan imunohistokimia pada jaringan kanker payudara dari pasien kasus penderita kanker payudara stadium IIIB Sub tipe Luminal sebelum mendapatkan kemoterapi neoajuvan di RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Adapun hasil pemeriksaan CD44 diperoleh data yang tersebar ditunjukkan pada tabel di bawah.

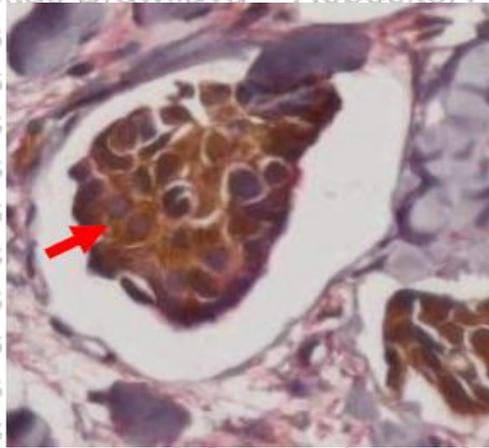
Tabel 5.5. Ekspresi CD44 jaringan kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal

Kelompok	n	Rerata	Selang kepercayaan 95%		p.value t-test
			Batas bawah	Batas atas	
Respons	19	40.47	17.84	63.10	0.001
Tidak respons	16	29.56	18.72	40.40	

Tampak pada Tabel 5.5 bahwa pada kelompok sampel pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal yang memberikan respons terhadap kemoterapi neoajuan sebanyak 19 orang pasien dengan rerata CD44 40.47 dan tersebar disekitar 17.84 – 63.10. Hal ini berarti bahwa apabila pasien kanker payudara respons terhadap kemoterapi neoajuan, maka akan menunjukkan CD44 yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak respons. Sedangkan pasien kanker payudara yang respons terhadap kemoterapi neoajuan sebanyak 16 orang pasien dengan rerata CD44 29.56 dan tersebar disekitar 18.72 – 40.40. Hal ini berarti bahwa apabila pasien kanker payudara tidak respons terhadap kemoterapi neoajuan 3 kali maka menunjukkan CD44 yang lebih rendah bila dibandingkan dengan yang respons. Hasil analisis uji beda dua kelompok terkait ekspresi CD44 menunjukkan p-value 0.001 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi CD44 pre kemoterapi yang signifikan antara dua kelompok pengamatan respons kemoterapi neoajuan pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal.

5.3.4. Ekspresi CD24

Hasil analisis ekspresi CD24 pada sel kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal di RSUD dr. Saiful Anwar Malang diuraikan sebagai berikut. Hasil pemeriksaan imunohistokimia yang didapatkan dari hasil hitung jumlah sel kanker pasien partisipan yang menunjukkan positif staining anti CD24 perseratus sel yang diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x, tergambar pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.4. Ekspresi CD24 pada jaringan kanker payudara

Keterangan: Hasil positif *immunoreactivity* ditandai dengan *membranous Staining* berwarna coklat pada sel kanker.

Gambar 5.4 menunjukkan ekspresi CD24 yang diamati pada jaringan kanker payudara dari pasien kasus penderita kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal sebelum mendapatkan kemoterapi neoajuvan yang berada di Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar Malang. Jaringan kanker tersebut dilihat dengan pemeriksaan imunohistokimia, dari hasil pemeriksaan menunjukkan hasil yang positif pada gambar diperlihatkan dengan *membranous staining* yang berwarna coklat pada sel kanker dengan pembesaran 400x yang ditunjukkan dengan ditandai anak panah. Adapun dari hasil penghitungan ekspresi CD24 diperoleh data yang tersebar ditunjukkan pada tabel di bawah.

Tabel 5.6. Ekspresi CD24 jaringan kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal

Kelompok	n	Rerata	Selang kepercayaan 95%		p-value t-test
			Batas bawah	Batas atas	
Respons	19	52.63	13.65	71.89	0.882
Tidak respons	16	51.31	24.20	78.18	

Dari Tabel 5.6 dapat dilihat bahwa pada kelompok sampel pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal yang respons terhadap kemoterapi neoajuvan sebanyak 19 orang pasien dengan rerata CD24 52.63 dan tersebar disekitar 13.65 – 71.89. Hal ini berarti

bahwa apabila pasien kanker payudara respons terhadap kemoterapi neoajuvan maka akan menunjukkan CD24 yang lebih rendah dibandingkan yang tidak respons. Sedangkan pasien kanker payudara yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan sebanyak 16 orang pasien dengan rerata CD24 51.31 dan tersebar disekitar 24.20 – 78.18. Hasil analisis uji beda dua kelompok terkait ekspresi CD24 menunjukkan p-value 0.882 yang berarti bahwa terdapat perbedaan tidak bermakna ekspresi CD24 sebelum pemberian kemoterapi neoajuvan 3 siklus di dua kelompok pengamatan berdasarkan respons terhadap kemoterapi neoajuvan

5.4. Analisis uji hipotesis

5.4.1. Hubungan antara ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44, CD24 dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin

Untuk melihat hubungan antara ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44, CD24 dengan respons terhadap kemoterapi neoajuvan peneliti menggunakan analisis chi-square test dengan validasi nilai koefisien *linear by linear association* seperti pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.7. Hasil chi square test hubungan ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44, CD24 dengan respons kemoterapi

Chi-square test Linear-by-Linear Association	Nilai	Asymptotic Significance (2-sided)
Vimentin	23.114	0.000
E-cadherin	22.120	0.000
CD44	99.120	0.002
CD24	0.023	0.878

Hasil analisis Tabel 5.7 menunjukkan bahwa nilai *linear-by-linear association* dari Vimentin 23.114 dan p.value 0.000 menunjukkan angka yang lebih kecil dari nilai , maka



dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi Vimentin dengan respons kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal. Nilai *linear-by-linear association* dari E-cadherin 22.120 dan p.value 0.000 menunjukkan angka yang lebih kecil dari nilai α , maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi E-cadherin dengan respons kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal. Nilai *linear-by-linear association* dari CD44 99.120 dan p.value 0.002 menunjukkan angka yang lebih kecil dari nilai α , maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi CD44 dengan respons kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal. Sedangkan Nilai *linear-by-linear association* dari CD24 0.023 dan p.value 0.878 menunjukkan angka yang lebih kecil dari nilai α , maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang tidak signifikan antara ekspresi CD24 dengan respons kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal.

5.4.2. Analisis diskriminan peran Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 sebagai prediktor respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal

Tahap analisis selanjutnya dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan prediktor respons kemoterapi neoajuan, maka lebih lanjut peneliti melakukan analisis potensi masing-masing parameter independen termasuk ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 sebagai prediktor respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal dengan analisis diskriminan. Analisis diskriminan merupakan tehnik yang akurat untuk memprediksi sebuah sampel termasuk dalam kategori apa, dengan catatan data-data yang dilibatkan atau dianalisis terjamin akurasiya. Analisis diskriminan pada dasarnya merupakan bagian dari analisis statistik multivariat yang bertujuan untuk melihat dependensi antara variabel dependen (yang berupa data kualitatif) dengan variabel independen (yang berupa data kuantitatif) dengan cara membentuk fungsi atau model diskriminan. Untuk membentuk fungsi diskriminan yang



digunakan peneliti adalah *simultaneous estimation*, dimana semua variabel independen dimasukkan secara bersama-sama kemudian dilakukan proses diskriminan. Keseluruhan analisis diskriminan yang dipilih peneliti ditujukan untuk menjawab hipotesis penelitian apakah ada perbedaan yang jelas pada kelompok variabel dependen berdasarkan ekspresi keempat variabel independen yang diamati. Adapun proses analisis diskriminan meliputi melalui beberapa tahapan analisis sebagai berikut :

5.4.2.1. Fungsi Diskriminan

Pada penelitian ini digunakan analisis diskriminan, dan diperoleh *canonical discriminant function coefficient* (pada lampiran) yang dirumuskan menjadi suatu persamaan sebagai berikut :

$$Y = -1.549 - 0.076 X_1 + 0.031 X_2 + 0.033 X_3 + 0.021 X_4$$

Keterangan:

Y = Respons kemoterapi (1 = tidak respons; 2 = respons)

X₁ = Vimentin

X₂ = E-cadherin

X₃ = CD44

X₄ = CD24

Persamaan ini merupakan hasil dari kombinasi linier dari berbagai variabel bebas (Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24) terhadap variasi hasil variabel tergantung (respons kemoterapi), yang kemudian digabungkan dan membentuk sebuah rumus persamaan.

Persamaan ini dimaksudkan untuk mengetahui bentuk fungsi linear variabel respons terhadap variasi ekspresi keempat variabel bebas yang dianalisis peneliti. Persamaan fungsi linear antar variabel ini kemudian diuji kekuatan signifikansinya dengan uji Wilks' lambda, jika nilai Wilks' ini berada dalam interval 0 sampai 1 dan semakin nilainya mendekati 0 berarti menunjukkan semakin signifikan keempat variabel tersebut sebagai pembeda kelompok respons yang diamati. Kombinasi linear dari masing-masing variabel akan membentuk suatu fungsi diskriminan. Dalam penelitian ini hasil analisis Wilks' lambda



menunjukkan p-value 0.000 sehingga bisa disimpulkan bahwa Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 signifikan sebagai penentu atau pembeda respons kemoterapi pada partisipan yang diamati dengan nilai korelasi kanonikal sebesar 0.899. Nilai korelasi yang dimaksud ini ditujukan untuk melihat seberapa besar kekuatan hubungan keempat variabel bebas sebagai penentuan keragaman variabel tergantung (respons kemoterapi), disini berarti bahwa variabel bebas mampu menjelaskan sebesar 80.82% (hasil kuadrat nilai 0.899) keragaman yang ada pada variabel tergantung, sedangkan sisanya sekitar 19.18 persen dijelaskan oleh residual atau variabel bebas lain di luar model.

5.4.2.2. Prediktor paling kuat

Dari keempat variabel yang diukur yaitu ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 selanjutnya dianalisis kekuatan prediktor dari masing-masing variabel terhadap prediksi respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin didasarkan hasil analisis koefisien fungsi diskriminan *canonical* yang terstandar didapatkan hasil sebagai persamaan berikut :

$$Z_Y = -0.697Z_{\text{vimentin}} + 0.525Z_{\text{E-cadherin}} + 0.487Z_{\text{CD44}} + 0.529Z_{\text{CD24}}$$

Berdasarkan hasil tersebut dapat diamati bahwa Vimentin merupakan prediktor respons kemoterapi paling kuat dengan nilai -0.697, berturut-turut kemudian disusul dengan prediktor kedua CD24 (0.529), kemudian E-cadherin (0.525) dan yang paling lemah adalah CD44 dengan nilai 0.487. Angka negatif yang ditunjukkan pada prediktor paling kuat yang dalam hal ini adalah Vimentin menunjukkan arah hubungan yang berbanding terbalik artinya semakin tinggi nilai ataupun ekspresi Vimentin akan cenderung tidak memberikan respons pasca kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal, sehingga peningkatan ekspresi Vimentin dalam penelitian kali ini dianggap sebagai penentu paling kuat terhadap respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin. Namun perlu diketahui bahwa Vimentin bukan satu-satunya penentu respons kemoterapi model prediktor yang dianalisis terkait dengan kadar ataupun ekspresi keempat variabel bebas yang diukur dalam penelitian ini.



5.4.2.3. Prediksi respons kemoterapi

Berdasarkan klasifikasi fungsi dari masing-masing variabel bebas terhadap respons kemoterapi dapat diprediksi bahwa kombinasi dari variabel Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 yang diukur melalui *Fisher's linear discriminant function analysis* dan didapatkan persamaan berikut :

$$YNR = -28,466 + 0,883 \text{ Vimentin} + 0,410 \text{ E-cadherin} + 0,131 \text{ CD44} + 0,041 \text{ CD24}$$

$$YR = -33,947 + 0,580 \text{ Vimentin} + 0,536 \text{ E-cadherin} + 0,262 \text{ CD44} + 0,123 \text{ CD24}$$

Keterangan :

YNR = tidak respons

YR = respons

Prediksi respons kemoterapi berdasarkan nilai masing-masing prediktor Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dianalisis dengan *Fisher's linear discriminant function analysis* program excel dan didapatkan dari persamaan di atas. Persamaan tersebut dapat diaplikasikan secara klinis dengan contoh kasus sebagai berikut :

Kasus 1

Seorang wanita usia 50 tahun dirawat dengan diagnosis *invasif carcinoma NST grade III*, status histopatologi ER(+), PR(+), HER2(-), Ki67 *high expression*, ukuran tumor pre kemoterapi 10 cm. hasil pemeriksaan Vimentin 15%, E-cadherin 89%, CD44 31% dan CD24 100%. Seperti apa prediksi respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin berdasarkan data pasien di atas?

Jawabannya ada pada Gambar 5.11 model excel yang ada di bawah ini:

Model Prediksi Respon Kemoterapi

Model Fisher Tidak Ada Respon : $YT = -28,466 + 0,883 \text{ Vimentin} + 0,410 \text{ E_cadherin} + 0,131 \text{ CD44} + 0,041 \text{ CD24}$
 Model Fisher Ada Respon : $YA = -33,947 + 0,580 \text{ Vimentin} + 0,536 \text{ E_cadherin} + 0,262 \text{ D44} + 0,123 \text{ CD24}$

AKURASI, SENSITIVITAS DAN SPESIFISITAS:

Kelompok	Predicted Group Membership		Total		
	Tidak Respons	Respons			
Original	Tidak Respons	15	1	16	Akurasi = 97,14286
	Respons	0	19	19	Sensitivitas = 100
Total		15	20	35	Spesifisitas = 88,23529

PREDIKTOR

Vimentin (%) = ? 15
 E-cadherin = ? 89
 CD44 = ? 31
 CD24 = ? 100

HASIL PREDIKSI

Skor Diskriminan Tidak Respons: 29,45
 Skor Diskriminan Respons: 42,852
 Hasil Prediksi: Respons

Gambar 5.11. Model prediksi respons kemoterapi kasus 1

Dari kasus 1 tersebut, keempat hasil IHK Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 masing-masing dimasukkan di dalam aplikasi model prediksi respons kemoterapi program excel SPSS. Gambar 5.11 menunjukkan bahwa untuk melakukan prediksi respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pada pasien tersebut, kemudian data Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dimasukkan dalam persamaan di atas dengan cara seperti berikut :

$$YNR = -33,947 + (0,580 \cdot 15) + (0,536 \cdot 89) + (0,262 \cdot 31) + (0,123 \cdot 100)$$

$$YR = -28,466 + (0,883 \cdot 15) + (0,410 \cdot 89) + (0,131 \cdot 31) + (0,041 \cdot 100)$$

Prediktor

Vimentin (%) = 15
 E-cadherin = 89



CD44 = 31
 CD24 = 100

Hasil Prediksi

Skor Diskriminan Tidak Respons: 29.45

Skor Diskriminan Respons: 42.852*

Hasil Prediksi: Respons

Kesimpulan akhir nilai prediksi respons kemoterapi ditentukan dari angka atau skor diskriminan respons yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan skor diskriminan tidak respons. Jika hasil aplikasi model prediksi ini dibandingkan dengan data medik klinis sesungguhnya pada pasien pasca pemberian kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin 3 kali maka hasilnya sebagai berikut:

Ukuran tumor pasca kemoterapi = 4 cm

Respons pasca kemoterapi berdasarkan diameter tumor pasca kemoterapi termasuk dalam kategori respons parsial (**respons** terhadap kemoterapi neoajuvan).

Hasil prediksi dengan menggunakan model prediktor respons kemoterapi penelitian

Hasil data sesungguhnya rekam medis pasien

Respons

Repons parsial (respons)

Hasil analisis berdasarkan rumusan model prediktor respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal tersebut juga diketahui bahwa model ini mempunyai:

Akurasi : 97,14

Sensitifitas : 100

Spesifisitas : 92,23

Kasus 2

Seorang wanita usia 46 tahun dirawat dengan diagnosis *Carcinoma Mamma Sinistra* grade II, status histopatologi ER(+), PR(+) HER2(++), Ki67 *low expression*, ukuran tumor pre

kemoterapi 8 cm. Hasil pemeriksaan Vimentin 56%, E-cadherin 39%, CD44 28% dan CD24 100%. Seperti apakah prediksi respons kemoterapi neoadjuvan berbasis antrasiklin berdasarkan data pasien di atas?

Jawabannya ada di dalam model prediksi pada Gambar 5.12 di bawah ini:

Model Prediksi Respon Kemoterapi					
Model Fisher Tidak Ada Respon :	YT = -28,466 + 0,883 Vimentin + 0,410 E_cadherin + 0,131 CD44 + 0,041 CD24				
Model Fisher Ada Respon	YA = -33,947 + 0,580 Vimentin + 0,536 E_cadherin + 0,262 D44 + 0,123 CD24				
AKURASI, SENSITIVITAS DAN SPESIFISITAS:					
	Kelompok	Predicted Group Membership		Total	
		Tidak Respon	Respon		
	Original	15	1	16	Akurasi = 97,14286
		0	19	19	Sensitivitas = 100
	Total	15	20	35	Spesifisitas = 88,23529
PREDIKTOR					
	Vimentin (%) = ?	56			
	E-cadherin = ?	39			
	CD44 = ?	28			
	CD24 = ?	100			
HASIL PREDIKSI					
	Skor Diskriminan Tidak Ada Respon:	44,76			
	Skor Diskriminan Ada Respon:	39,046			
	Hasil Prediksi:	Tidak ada Respon			

Pada kasus 2, keempat hasil IHK Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 masing-masing dimasukkan di dalam aplikasi model prediksi respons kemoterapi program excel.

Gambar 5.12. Model prediksi respons kemoterapi kasus 2



Pada Gambar 5.12 di atas, bahwa untuk melakukan prediksi respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien diatas maka data Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 dimasukkan dalam persamaan yang telah sebutkan di atas dengan cara seperti berikut :

$$YNR = -28,466 + (0.883*56) + (0,410*39) + (0,131*28) + (0,041*100)$$

$$YR = -33,947 + (0.580*56) + (0,536*39) + (0,262*28) + (0,123*100)$$

Prediktor

Vimentin (%) =	56
E-cadherin =	39
CD44 =	28
CD24 =	100

Hasil Prediksi

Skor Diskriminan Tidak Respons: 44.76*

Skor Diskriminan Respons: 39.046

Hasil Prediksi: Tidak Respons

Bila dibandingkan dengan data sesungguhnya dari rekam medik pasien pasca pemberian kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin 3x sebagai berikut:

Ukuran tumor pasca kemoterapi = 6 cm

Respons pasca kemoterapi berdasarkan diameter tumor pasca kemoterapi termasuk dalam kategori *stable disease* (tidak respons).

Hasil prediksi dengan menggunakan model prediktor respons kemoterapi penelitian

Hasil data sesungguhnya dari rekam medis pasien

Tidak respons

Stable disease
(tidakrespons)

Berarti bahwa bila hasil-hasil ekspresi keempat parameter ini bila dimasukkan ke dalam model aplikasi prediktor kombinasi ini ternyata sesuai dan cocok dengan kondisi riil secara

faktual pada pasien. Hal ini tentu saja akan sangat berguna bila nantinya diterapkan kepada pasien yang akan diberikan kemoterapi.

Dari Gambar 5.11 dan Gambar 5.12 di atas dan setelah semua data ke 35 orang pasien dimasukkan di dalam model aplikasi, maka tergambar bahwa data hasil imunohistokimia variabel bebas yang dimasukkan dalam model prediksi menunjukkan kesesuaian dengan data medik faktual sesungguhnya respons kemoterapi berdasarkan ukuran tumor pasca kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin pasien partisipan, dan dilakukan analisis validitas.

Validitas test model prediksi:

Akurasi : 97.14

Spesifitas : 88.23

Sensitifitas : 100

Hasil analisis model prediksi respons kemoterapi yang didapatkan menunjukkan nilai akurasi 97.14, sensitifitas 100, spesifitas 88,23%, dimana nilai tersebut merupakan sebuah penghitungan statistik untuk menilai akurasi dari sebuah prediksi. Pada dasarnya setiap model prediksi dibuat sebelum nilai dari entitas yang diprediksi tersebut dikenal. Oleh karena itu, diperlukan sebuah metode untuk mengevaluasi akurasi dari berbagai prediksi tersebut (Gonen *et al.*, 2007). Selanjutnya kemudian analisis lanjutan mengacu pada sebaran data pasien partisipan, dimana sensitivitas diukur berdasarkan proporsi jumlah pasien partisipan yang menunjukkan respons terhadap kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin sedangkan nilai spesifitas didefinisikan sebagai proporsi dari jumlah pasien partisipan yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin. Selanjutnya setiap data dari hasil pemeriksaan IHK ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 ketiga puluh lima (35 orang) partisipan dimasukkan satu per satu di dalam aplikasi model prediksi di atas, dimana semua hasilnya ada di dalam lampiran.



BAB VI PEMBAHASAN

6.1. Karakteristik sampel penelitian

Partisipan dalam penelitian ini sebanyak 35 orang pasien dengan diagnosis kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal yang ditetapkan melalui beberapa prosedur diagnostik standar antara lain penilaian staging TNM, pemeriksaan histopatologi dan pemeriksaan imunohistokimia ER, PR, HER2, Ki67, yang direncanakan untuk diberikan kemoterapi neoajuvan. Dari hasil biopsi jaringan kanker payudara sebelum kemoterapi, dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk menilai ekspresi parameter molekuler Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24. Pemilihan subtipe Luminal karena jenis tersebut yang paling banyak ditemukan (lebih kurang 55%) di RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Sel tumor Luminal adalah sel tumor yang muncul dimulai dari sel kanker yang berada di dalam lumen (sel inner dari duktus laktiferus). Secara klinis praktis subtipe Luminal, yaitu Luminal A dan Luminal B ditandai dengan hasil imunohistokimia ER (estrogen reseptor) positif dan atau PR (progesteron reseptor) positif, apapun hasil ekspresi HER2 dan Ki67 maka pasti termasuk subtipe Luminal A atau subtipe Luminal B. Subtipe Luminal ini mempunyai survival yang relatif lebih baik dari pada subtipe non-Luminal dan merupakan jumlah terbanyak dari keseluruhan subtipe kanker payudara. Selain termasuk jenis dan type kanker payudara yang paling sering dijumpai, baik subtipe Luminal A ataupun Luminal B secara epidemiologi mempunyai angka rekurensi 27.8 - 30% dan angka metastatis 10 - 20 % dan waktu rekurensi 1.6 - 2.2 tahun (Lim *et al.*, 2011; Castellano *et al.*, 2013; Cheang *et al.*, 2009), dan hanya 7% dari keseluruhan partisipan yang menunjukkan respons komplit terhadap kemoterapi dengan $p < 0.01$ pada penelitian Carey *et al.*, 2007.

Stadium lanjut lokal (*locally advanced breast cancer*), yaitu stadium IIIA, IIIB, IIIC, sedangkan dalam penelitian ini stadium yang dipilih adalah stadium IIIB saja, yaitu tumor berukuran > 5 sm, terdapat infiltrasi sel kanker pada kulit antara lain ulkus, nodul satelit dan



peau d'orange (kulit payudara seperti kulit jeruk). Standar terapi kanker payudara stadium lanjut lokal (salah satunya stadium IIIB) ini adalah kemoterapi neoajuvan yang diberikan sebelum prosedur pembedahan (Loibl *et al.*, 2006) dan diharapkan efektif untuk menurunkan ukuran tumor dan mematikan sel mikrometastatik (Kim *et al.*, 2010), sedangkan untuk kasus kanker payudara stadium dini (I dan II) umumnya dilakukan prosedur pembedahan terlebih dahulu baru dilanjutkan dengan pemberian kemoterapi ajuvan.

Berdasarkan data karakteristik sampel hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rerata usia pasien adalah 49.51 tahun yang tersebar mulai usia 43 tahun sampai 55 tahun. Pasien dengan kasus kanker payudara biasanya diderita wanita usia menjelang 50 tahun atau premenopause. Setelah menjalani 3 kali kemoterapi neoajuvan, dari keseluruhan responden 19 orang pasien memperlihatkan respons positif (respons komplit dan respons parsial) terhadap kemoterapi neoajuvandan 16 orang pasien menunjukkan tidak respons (respons stabil dan respons progresif) setelah pemberian kemoterapi neoajuvan 3 kali.

Berdasarkan data hasil penelitian ini diketahui bahwa untuk penilaian kelenjar getah bening pada semua sampel diketahui ada 22.86% responden yang tidak ditemukan penyebaran pada kelenjar getah bening dan 57.14% partisipan ditemukan positif terjadi penyebaran pada kelenjar getah bening. Ada berbagai macam faktor prognostik dan prediktif respons terhadap berbagai modalitas terapi kanker payudara termasuk respons terhadap kemoterapi neoajuvan. Secara konvensional selama ini status kelenjar getah bening dan ukuran tumor digunakan sebagai dasar prediktif respons kemoterapi neoajuvan. Namun memang masih terdapat kontroversi dimana pada beberapa studi seperti yang dilakukan Hansen menyebutkan bahwa tidak ada perbedaan survival yang signifikan antara kelompok kontrol tanpa pembesaran kelenjar getah bening dengan kelompok yang terdapat pembesaran kelenjar getah bening (KGB) ($p=0,052$) (Rakha *et al.*, 2010).

Pada penelitian ini, pemeriksaan imunohistokimia ekspresi estrogen reseptor (ER) yang menunjukkan positif adalah pada semua sampel penelitian yaitu 35 orang (100%). Demikian pula pada pemeriksaan progesteron reseptor menunjukkan semua sampel 35



orang ditemukan hasil positif karena memang pasien dengan ER(+) dan PR(+) merupakan responden yang dipilih sesuai kriteria subtype Luminal. Reseptor hormon steroid seperti estrogen reseptor (ER), progesteron reseptor (PR) dan onkogen ErbB-2/reseptor *human epidermal growth factor-2* (HER2) merupakan faktor prediktif yang penting pada pengelompokan kanker payudara dan untuk menentukan respons terhadap terapi dan prognosis penderita (Nofech-Mozes *et al.*, 2009). Didukung pula dari studi lain yang menyatakan bahwa subtype Luminal kanker payudara ditandai dengan imunohistokimia ER (estrogen reseptor) positif dan PR (progesteron reseptor) positif, mempunyai survival yang relatif lebih baik dari pada subtype non-Luminal dan merupakan jumlah terbanyak dari keseluruhan subtype kanker payudara (Blows *et al.*, 2010). Demikian pula dengan temuan dari Creighton *et al.* (2012), bahwa subtype Luminal mencakup 10-20% dari kasus kanker payudara, dari pemeriksaan histokimia ditandai ER(+) dan atau PR(+), dan ekspresi HER2(+).

Sedangkan hasil pemeriksaan pada HER2 menunjukkan ada 8 orang negatif (22.86%). Pemeriksaan terbanyak ditemukan ada HER positif (+1) ada 20 orang (57.14%).

Selanjutnya ditemukan pada *double positive* (+2) ada 5 orang (14.29%) dan terakhir ada 2 orang (5.71%) ditemukan *triple positive* (+3). Pada kanker payudara dengan HER2 positif menunjukkan peningkatan jumlah protein HER2 yang terdapat pada permukaan sel tumor.

Tingkat ekspresi HER2 yang tinggi menunjukkan bahwa kanker payudara sangat ganas dan penyakit ini pada umumnya sangat kurang memberikan respons terhadap kemoterapi. Jika

hasil tes menunjukkan HER2 positif artinya protein tersebut ditemukan dalam jumlah berlebih, dan bertindak sebagai reseptor yang mendorong pertumbuhan sel. Sekitar 15

hingga 20 persen kasus kanker payudara di dunia merupakan kanker payudara dengan HER2 positif. Kanker payudara dengan HER2 positif terdapat mutasi atau perubahan

abnormal dalam DNA yang dapat menghasilkan protein HER2 berlebih dalam sel kanker payudara. Mutasi genetik yang menyebabkan kanker payudara positif HER2 disebut mutasi

diakuisisi. Kanker dengan HER2 berlebih cenderung tumbuh dan menyebar lebih cepat daripada jenis kanker payudara lainnya. Pada berbagai penelitian menunjukkan bahwa



HER2 yang positif mempengaruhi prognosis sekitar 20-30 persen wanita penderita kanker payudara. Didalam kepentingan klinis praktis penilaian hasil imunohistokimia HER2, bila HER2 (+3) maka direkomendasikan untuk diberikan *targetted therapy* trastuzumab, sedangkan bila HER2(+2) harus dilakukan validasi dengan pemeriksaan *fluorescent in situ hybridization* (FISH), sedangkan HER2 (+1) dianggap negatif.

Pada pemeriksaan Ki67, ditemukan Ki67 yang tinggi diantara 35 orang pasien ada 28 orang (80%) dan yang rendah ditemukan 7 orang (20%). Hal ini serupa dengan penelitian Creighton (2012), bahwa subtype Luminal B mencakup 10-20% dari kasus kanker payudara dan dari pemeriksaan imunohistokimia ditandai dengan Ki67 yang tinggi.

Pengamatan klinis yang peneliti dapatkan selama ini menunjukkan bahwa pasien dengan HER2 (+3) secara klinis cenderung lebih ganas, dan Ki67 *high expression* menunjukkan kemampuan proliferasi yang progresif, namun pada hasil analisis statistik parameter ini tidak menunjukkan korelasi dengan parameter biomolekuler lain ataupun dengan respons kemoterapi.

Penilaian obyektif respons pemberian kemoterapi terdiri dari perubahan ukuran tumor, dan perubahan gejala klinis misal rasa nyeri, perdarahan, ulkus dan bau yang mengganggu. Respons klinis kanker payudara terhadap kemoterapi didasarkan pada RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), dimana terdapat 4 (empat) respons yaitu respons komplit, respons parsial, *stable disease* dan *progressive disease*. Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata ukuran tumor sebelum pemberian kemoterapi neoajuan 8.57 ± 5.86 sedangkan pasca pemberian kemoterapi neoajuan 3 siklus data menunjukkan rata-rata ukuran tumor 3.23 ± 2.55 .

Sebaran data grading menunjukkan bahwa dari hasil pemeriksaan mikroskopis imunohistokimia pada jaringan kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal antara kelompok yang memperlihatkan respons terhadap kemoterapi-neoajuan dengan yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuan keduanya menunjukkan sebaran yang bervariasi pada skala ordinal. Sebaran data grade antara kelompok sampel yang respons ada 19 orang (54,3%) dan kelompok sampel yang tidak respons ada 16 orang (45.7%), jadi di sini



menunjukkan ada pengaruh yang bermakna ($p=0.013<\alpha$) pemeriksaan grade terhadap perubahan ukuran tumor sebagai efek dari kemoterapi neoajuvan. Pada kelompok sampel yang respons terhadap kemoterapi neoajuvan terbanyak pada grade ke-3 yaitu 13 orang (68.4%) dibandingkan dengan grade yang lain, hal ini berarti respons kemoterapi lebih besar bila grade lebih tinggi. Sedangkan pada kelompok sampel yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan terbanyak pada grade ke-2 yaitu 10 orang (62.5%) dibandingkan dengan grade yang lain.

6.2. Ekspresi Vimentin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal

Migrasi sel memainkan peranan penting dalam perkembangan janin, penyembuhan luka, regenerasi, inflamasi dan respons imun terhadap sel kanker. Vimentin sudah diketahui merupakan protein penanda kemampuan migrasi sel, meskipun peran Vimentin dalam migrasi sel masih belum jelas. Studi terkini menjelaskan fungsi Vimentin terkait kemampuan migrasi sel yang disebabkan oleh adanya polaritas seluler, regulasi formasi ikatan seluler dan transport sinyal protein pada pergerakan seluler. Pada dasarnya migrasi merupakan pergerakan sel secara langsung sebagai respons terhadap stimulus ekstraseluler antara lain sitokin, *growth factor* dan perubahan kimia dan substrat mekanik. Peningkatan ekspresi Vimentin pada sel kanker berhubungan dengan peningkatan kemampuan migrasi dan invasi sel kanker baik menuju sirkulasi sistemik ataupun ke jaringan sekitar. Pada kebanyakan tumor epitelial, ekspresi Vimentin akan meningkat selama proses metastasis, dan terjadi pula peningkatan motilitas dan kemampuan invasif sel tumor. Peningkatan ekspresi Vimentin pada sel tumor berdampak pada motilitas sel dan kemampuan invasi (Kalluri *et al.*, 2009).

Pemeriksaan imunohistokimia jaringan kanker payudara IIIB subtype Luminal diambil sebelum pasien menjalani kemoterapi neoajuvan, kemudian dinilai ekspresi Vimentinnya dengan pengamatan di bawah mikroskop, hasil yang positif akan memperlihatkan *membranous staining* yang berwarna coklat melingkari sel kanker. Sepertidijelaskan oleh



Thieri *et al.* (2009) yang menyebutkan bahwa Vimentin merupakan protein dengan berat molekul 57 KD *intermediated filament* tereksresi pada sel mesenkim, teridentifikasi melalui *membranous staining* pada berbagai jenis kanker epitelial termasuk kanker payudara dan diketahui perannya dalam menjaga integritas dan kekebalan seluler terhadap *stress agent*. Overeksresi Vimentin pada sel tumor berhubungan dengan peningkatan pertumbuhan tumor, invasi dan prognosis yang buruk (Zheng *et al.*, 2015). Secara epidemiologi ekspresi Vimentin meningkat pada sel epitelial kanker termasuk di antaranya adalah kanker payudara yang mempunyai karakteristik reseptor estrogen (ER) yang rendah/negatif. Dari penelitian ini, keseluruhan responden kelompok dengan rerata Vimentin 18.68% tersebar pada kisaran rentang 9.57% - 27.79% cenderung menunjukkan respons terhadap pemberian kemoterapi neoajuan 3 siklus. Dan pada kelompok dengan rerata ekspresi Vimentin 44.81% dan tersebar disekitar 35.51% - 54.11% menunjukkan respons terhadap kemoterapi neoajuan yang lebih rendah. Ekspresi Vimentin selama aktivasi mekanisme EMT menunjukkan hubungan berbanding lurus dengan kemampuan motilitas seluler, peningkatan ekspresi gen yang berhubungan dengan plastisitas sel dan kemampuan invasi (Li *et al.*, 2015). Dari hasil data rerata Vimentin pada penelitian ini didapatkan bahwa ekspresi Vimentin menunjukkan peningkatan respons kemoterapi yang buruk jika nilai ekspresinya berada pada batasan angka 44.81%, demikian pula berdasarkan penelitian ini salah satu hal yang harus diperhatikan untuk memprediksi peluang respons komplit terhadap kemoterapi adalah bila pasien menunjukkan hasil ekspresi Vimentin < 18.68%.

Hasil perbandingan kedua kelompok tersebut menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) antara kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuan dengan yang tidak respons terhadap kemoterapi. Ekspresi Vimentin pada kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuan (18.68 ± 9.11) lebih kecil dibandingkan dengan Vimentin pada kelompok tidak respons terhadap kemoterapi neoajuan (44.81 ± 9.30), sedangkan hasil analisis uji beda dua kelompok menunjukkan p-value 0.000 yang berarti bahwa ada perbedaan ekspresi Vimentin pada kedua kelompok pengamatan baik yang



menunjukkan respons terhadap kemoterapi maupun yang tidak respons. Saat ini belum ada publikasi dari hasil penelitian yang menyebutkan batasan nilai normal (*cut-off point*) ekspresi Vimentin pada sel epitelial kanker. Namun beberapa sebelumnya menyebutkan bahwa ekspresi Vimentin berhubungan dengan lesi metastatik dan merupakan indikator buruknya prognosis. Hambatan ekspresi Vimentin melalui induksi withaferin-A pada jaringan sarkoma menghambat pertumbuhan, rekurensi dan metastasis. Di dalam salah satu kajian Vimentin pada tumor prostat model tikus ataupun studi pada *cell line* menunjukkan bahwa pemberian withaferin-A menunjukkan hambatan invasi, motilitas dan migrasi sel kanker (Pasquier *et al.*, 2015).

Penelitian-penelitian tersebut di atas juga sesuai dengan data hasil penelitian ini yang menyebutkan bahwa nilai korelasi parameter Vimentin (-0.697) merupakan prediktor paling kuat dibandingkan dengan parameter lain yang dianalisis dalam penelitian ini seperti E-cadherin (0.525), CD44 (0.487) ataupun CD24 (0.529). Nilai negatif dari parameter Vimentin menunjukkan arah korelasi kedua variabel bahwa semakin tinggi ekspresi Vimentin maka semakin meningkatkan risiko tidak respons (*stable* atau progresif). Hal ini berkaitan dengan teori yang menjelaskan bahwa Vimentin merupakan regulasi terhadap protein Axl, Slug dan Ras yang merupakan gen penginduksi kemampuan migrasi sel kanker payudara (Satelli *et al.*, 2011).

Hasil pemeriksaan imunohistokimia pada jaringan kanker payudara menunjukkan bahwa ekspresi Vimentin dominan ditemukan pada jenis *high grade ductal carcinoma* dengan level estrogen reseptor (ER) yang rendah. Namun pada penelitian ini tidak dikaji korelasi antara estrogen reseptor dengan ekspresi Vimentin karena secara prosedural reseptor estrogen ER(+) dan progesteron receptor PR(+) merupakan kriteria inklusi yang sengaja dipilih, sehingga dari keseluruhan partisipan penelitian ini menunjukkan ekspresi ER(+) dan PR(+). Indikasi peran Vimentin terhadap peningkatan kemampuan migrasi sel didasari bahwa Vimentin memediasi ikatan antara actin dan mikrotubul termasuk memfasilitasi struktur sitoskeleton dan meningkatkan efek mekanik aliran darah dan berkontribusi terhadap polaritas dan motilitas seluler.



6.3. Ekspresi E-cadherin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal

Sel epitel secara fisiologis melekat satu sama lain dengan berbagai jenis *protein junctions* yang menjaga integritas fungsional jaringan epitel dan ekspresi E-cadherin dihubungkan dengan fenotif sel epitel. E-cadherin merupakan protein adesi transmembran yang sangat tergantung pada kadar kalsium dengan berat molekul 120kDa dan terletak pada *adherens junction*, protein ini sering disebut sebagai marker sel epitel normal. Kerusakan *junctional* epitelial akan meningkatkan progresifitas dan kemampuan metastasis sel kanker, juga meningkatkan kemampuan pelepasan sel kanker dari tumor primer menuju sirkulasi atau sistem limfatik. Dengan kata lain penurunan ekspresi E-cadherin (*abberant expression*) berhubungan dengan progresifitas dan metastasis tumor.

Batasan untuk ekspresi E-cadherin menurut pembagian kategori ekspresi normal dan penurunan ekspresi E-cadherin merujuk pada C. Sucui *et al.*, 2008 yang menyebutkan batasan jumlah sel dengan karakteristik E-cadherin antibodi staining positif <10% sel menunjukkan sel kanker mudah migrasi dan metastasis, sedangkan E-cadherin >20% termasuk dalam kategori ekspresi normal. Secara umum tumor dengan ekspresi E-cadherin yang rendah akan lebih invasif dan mempunyai kemungkinan lebih besar untuk invasi ke kelenjar getah bening. Ekspresi E-cadherin yang rendah pada kanker payudara berhubungan dengan metastasis kelenjar getah bening, grading yang tinggi dan perilaku tumor yang buruk, namun beberapa studi menunjukkan bahwa metastatis kelenjar getah bening pada kasus kanker payudara justru menunjukkan ekspresi E-cadherin yang rendah dibandingkan dengan kasus kanker payudara tanpa metastatik kelenjar getah bening. Salah satu hipotesis yang menyebutkan bahwa ekspresi dan fungsi E-cadherin menurun secara bertahap diduga berhubungan dengan migrasi sel tumor dalam sistem sirkulasi dan dalam jaringan peritumoral (jaringan sekitar tumor). Proses tersebut diikuti oleh mekanisme reekspresi E-cadherin pada sel tumor, sehingga fakta ini dapat menjelaskan bahwa ekspresi E-cadherin pada jaringan metastatik cenderung sama atau lebih tinggi dibandingkan dengan

ekspresi pada tumor primer. Selain itu disebutkan juga ukuran tumor yang meningkat berbanding lurus dengan ekspresi E-cadherin, hal ini dibuktikan dengan studi yang menjelaskan bahwa ukuran tumor < 2 cm menunjukkan ekspresi e-cadherin yang lemah < 14%, dan persentase tersebut meningkat sampai 25% pada tumor dengan ukuran lebih dari 2 cm (Suci *et al.*, 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi E-cadherin pada kelompok respons terhadap kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok pengamatan yang tidak respons. Ekspresi E-cadherin diamati dengan pemeriksaan imunohistokimia pada jaringan kanker penderita kanker payudara stadium III B subtype Luminal, pemeriksaan menunjukkan positif bila ada *membranous staining* yang berwarna coklat melingkari sel kanker. Disebutkan bahwa E-cadherin merupakan penanda sel epitel yang merupakan protein transmembran yang bertanggungjawab terhadap ikatan antar sel dan membentuk *adherens junction* serta secara fisiologis E-cadherin berikatan dengan dan Catenin (Heboort, 2015). Hilangnya ekspresi E-cadherin dikaitkan dengan peningkatan ekspresi Snail, Zeb dan Twist yang diketahui sebagai repressor E-cadherin selama aktivasi EMT.

Hasil pemeriksaan E-cadherin pada kelompok pengamatan didapatkan bahwa kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuan 3 siklus mempunyai rerata ekspresi E-cadherin 69.16 tersebar pada rentangan 48.75 – 89.57. Angka tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang tidak respons terhadap pemberian kemoterapi yang mempunyai rerata 24.81 yang tersebar pada rentangan 14.24 – 35.38. Hal ini berarti bahwa ekspresi E-cadherin yang tinggi pada kondisi sebelum kemoterapi mempunyai peluang prediktif respons yang lebih tinggi terhadap kemoterapi neoajuan.

Hasil perbandingan kedua kelompok tersebut menunjukkan ada perbedaan ekspresi E-cadherin yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) antara kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuan dengan yang tidak respons terhadap kemoterapi. E-cadherin pada kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuan (69.16 ± 20.41) lebih besar



dibandingkan dengan E-cadherin pada kelompok yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan (24.81 ± 10.57). Berarti bahwa ada hubungan ekspresi E-cadherin pre kemoterapi pada pasien yang didiagnosis kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal dengan respons kemoterapi neoajuvan. Hasil penelitian ini pada dasarnya mengacu pada konsep aktifitas EMT yang menunjukkan bahwa E-cadherin merupakan protein yang berperan sebagai supresi tumor dan *invasion-supressive role*. Penurunan atau gangguan ekspresi E-cadherin dikaitkan dengan penurunan *disease-free survival* dan berbagai indikator prognosis yang buruk, antara lain pembesaran ukuran tumor, peningkatan grading dan perkembangan metastasis jauh. Namun hilangnya ekspresi E-cadherin tidak dapat digunakan sebagai prediktor tunggal terhadap potensi metastatik atau *outcome* yang negatif, hal ini dikaitkan dengan ekspresi E-cadherin yang mulai menurun terjadi pada tahap pra invasif (Kowalsky *et al.*, 2003).

Pada kanker payudara, mekanisme invasi dan migrasi didasari oleh perubahan morfogenesis dari sel epitel normal akibat penurunan dari E-cadherin, yang kemudian membentuk kondisi hiperplasia sel dalam bentuk sel yang imatur (progenitor) yang dalam keadaan ganas akan terjadi perubahan sel yang bersifat mesenkimal, memiliki sifat dasar sel progenitor yang mempunyai kemampuan invasi secara instrinsik dan mampu melakukan transformasi maligna secara independen. Selanjutnya ekspresi gen yang berperan dalam progresifitas dan metastasis pada area tumor primer seperti PTGS2/ COX2, MMP-1, EGFRL akan meningkatkan angiogenesis (Quail *et al.*, 2014).

6.4. Ekspresi CD44 pada pasien kanker payudara stadium IIIB sub tipe Luminal

CD44 merupakan reseptor glikoprotein transmembran yang berperan dalam adesi sel, dan ekspresinya di regulasi oleh kondisi lingkungan mikro yang hipoksia, overekspresi CD44 ditemukan pada progresi kanker yang agresif sehingga memungkinkan CD44 menjadi protein target dalam pengembangan terapi untuk mengeliminasi sel kanker yang agresif (Jin *et al.*, 2016).

Dari hasil pemeriksaan CD44 pada kelompok dengan respons terhadap kemoterapi neoajuvan menunjukkan rerata ekspresi CD44 40.47 (17.84 - 63.10). Sedangkan pada kelompok tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan menunjukkan rerata ekspresi CD44 29.56 (antara 18.72 - 40.40). Hasil perbandingan kedua kelompok tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0.001 > \alpha$) antara kelompok yang memperlihatkan respons terhadap kemoterapi neoajuvan dengan yang tidak respons efek kemoterapi.

CD44 merupakan suatu kompleks glikoprotein transmembran dengan berat 80 – 85 kDa, yang mempunyai peranan baik dalam proses fisiologis maupun proses patologis, termasuk di antaranya adalah adesi sel, inflamasi dan perkembangan tumor. Pada berbagai jenis kanker, CD44 terekspresi pada permukaan sel kanker yang berperan besar pada tahap inisiasi, metastasis dan tumorigenesis. Berbeda dengan CD44, maka CD24 merupakan molekul protein yang dapat dijumpai di permukaan sel yang tertambat pada *glycosyl-phosphatidyl-inositol* (GPI) (Appalaraju *et al.*, 2012). Sebenarnya ekspresi CD24 dapat ditemukan pada semua jenis tumor solid, namun pada beberapa penelitian terhadap kanker payudara ekspresinya ditunjukkan dalam bentuk kombinasi double staining CD44/CD24. Secara konseptual terdapat keterikatan antara mekanisme represi E-cadherin dengan peningkatan ekspresi CD44, hal ini dikarenakan translokasi β -catenin ke nukleus justru akan menyebabkan efek *downstream* berupa peningkatan ekspresi dan stabilisasi CD44. Hasil penelitian ini tidak menilai hubungan antara Vimentin dan E-cadherin terhadap ekspresi CD44.

Overekspresi dari populasi CD44 yang tinggi atau yang lazim disebut CD44+ dan CD24 yang rendah atau yang kemudian disebut CD24- berhubungan dengan resistensi kemoterapi, hal ini dikaitkan dengan kemampuan sel dengan karakter tersebut mampu memompa keluar obat yang masuk ke dalam sel dengan bantuan glikoprotein P. Sel yang menunjukkan CD44 tinggi dan CD24 yang rendah mempunyai tingkat progresifitas yang lebih lambat dibandingkan dengan sel yang mengekspresikan CD44 rendah dan CD24 yang

tinggi. Sedangkan penelitian lain menyebutkan bahwa peningkatan ekspresi CD44 yang tinggi dan CD24 yang rendah mempunyai korelasi kuat dengan metastasis kelenjar getah bening dan berhubungan dengan nilai hasil terapi yang buruk berdasarkan indikator faktor prediktif grading histologi tumor maupun indeks proliferasi sel (Wei *et al.*, 2012).

6.5. Ekspresi CD24 pada pasien kanker payudara stadium IIB subtype Luminal

CD24 merupakan protein permukaan sel yang tereksresi pada granulosit dan berbagai sel yang sedang berkembang termasuk sel B, keratinosit dan epitelial tubulus renal dan juga tereksresi pada berbagai jenis keganasan. CD24 merupakan ligand dari P-selectin dan dapat memicu penyebaran sel tumor dengan marker CD24 (Schostak *et al.*, 2006).

Secara fungsional CD24 dapat meningkatkan potensi metastasis pada sel kanker yang disebutkan juga oleh beberapa studi sebelumnya. Penelitian-penelitian tersebut yang menyatakan bahwa overekspresi CD24 ditemukan pada banyak jenis jaringan kanker.

Senner menyebutkan dalam hasil penelitiannya bahwa CD 24 menstimulasi migrasi glioma baik *in vivo* dan *in vitro*. CD24 pada beberapa studi disimpulkan sebagai marker penting pada diagnosis dan prognosis kanker, pada kanker paru CD24 merupakan marker *independen survival rate* pasien (Deng *et al.*, 2012).

Dari penelitian ini tampak bahwa nilai rerata \pm SD CD24 pada kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuvan (52.63 ± 19.12) sedikit lebih besar dibandingkan dengan rerata \pm SD CD24 pada kelompok yang tidak respons terhadap kemoterapi neoajuvan (51.31 ± 26.99). Hasil perbandingan kedua kelompok tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan yang tidak bermakna ($p=0.88 > \alpha$) antara kelompok yang respons terhadap kemoterapi neoajuvan dengan yang tidak respons terhadap kemoterapi.

Tumorigenesis melibatkan mekanisme biologis yang kompleks, karakteristik sel tunggal mungkin tidak cukup untuk mengidentifikasi sel-sel dengan potensi tumorigenik



secara lengkap. Pemahaman keseluruhan dari tumorigenik sel pada kanker payudara telah banyak diteliti dengan melihat tumor marker permukaan sel CD44/CD24, namun, relevansi fungsionalnya dalam tumorigenesis masing-masing CD44 dan CD24 belum sepenuhnya dipahami (Abraham *et al.*, 2005).

Karakter sel yang mengekspresikan CD24 menunjukkan perilaku sel yang lambat membelah, mempunyai tingkat resistensi yang tinggi pada kemoterapi primer dan radiasi. Sel dengan kecepatan pembelahan yang lambat tidak bisa menjadi sasaran dari kebanyakan zat kemoterapi. Secara umum hampir semua pustaka menyebutkan bahwa ekspresi CD24 pada kanker payudara menunjukkan karsinoma yang lebih invasif, prognosis yang buruk, grading histopatologi yang tinggi, ukuran tumor lebih besar, metastasis kelenjar getah bening dan resisten terhadap kemoterapi. Namun dari berbagai penelitian memang terdapat perbedaan hasil seperti pada penelitian oleh Cao X. *et al.*, 2014, yang meneliti CD44 dan CD24 bahwa tidak ada korelasi yang signifikan antara ekspresi CD24 dan waktu kelangsungan hidup secara keseluruhan (uji log-rank, $P = 0,115$). Analisis regresi multivariat menunjukkan bahwa ekspresi CD44 ($P = 0,029$), TNM staging ($P < 0,001$), dan invasi limfovaskular ($P = 0,016$), tetapi bukan ekspresi CD24 ($P = 0,065$), merupakan faktor prognostik independen dan resistensi terhadap kemoterapi. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa CD24 tidak berhubungan dengan faktor prognostik dan prediktif, dan masih meninggalkan pertanyaan yang belum jelas. Karena itu dibutuhkan penelitian-penelitian lain untuk memperjelas hubungan ekspresi CD24 dengan kator-faktor prognostik, prediktif kanker payudara dan respon terhadap kemoterapi.

6.6. Potensi kombinasi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24+ sebagai model prediktor respons kemoterapi neoajuvan pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtype Luminal

Pendekatan diagnosis kanker payudara yang tepat sangat penting dikembangkan mengingat berbagai faktor yang terlibat dalam keberhasilan terapi kanker payudara di RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Prosedur standar yang sampai saat ini digunakan untuk



manajemen tumor payudara yang dicurigai sebagai kanker payudara stadium lanjut lokal IIB adalah pemeriksaan klinis, penentuan stadium TNM, biopsi untuk pemeriksaan histopatologi, dan bila pemeriksaan histopatologi positif kanker payudara maka dilanjutkan dengan pemeriksaan imunohistokimia ekspresi ER,PR, HER2 dan Ki67 sebelum diberikan kemoterapi neoajuvan, namun ternyata hal ini belum secara keseluruhan memberikan informasi yang cukup tentang prediksi respon kemoterapi. Meskipun hasil pemeriksaan imunohistokimia menunjukkan hasil yang layak untuk dilakukan kemoterapi pada keseluruhan partisipan yang diamati pada penelitian ini namun pada kenyataannya respon yang terjadi setelah pemberian kemoterapi yang berdasarkan perubahan diameter ukuran tumor masih sangat bervariasi.

Merujuk pada pendekatan biomolekular, mekanisme invasi dan migrasi kanker payudara didasari oleh perubahan morfogenesis dari sel epitel normal akibat penurunan dari E-cadherin, yang kemudian membentuk kondisi hiperplasia sel dalam bentuk sel yang imatur (progenitor) yang dalam keadaan ganas akan terjadi perubahan sel yang bersifat mesenkimal, dan memiliki sifat dasar sel progenitor yang mempunyai kemampuan invasi secara instrinsik mampu melakukan transformasi maligna secara independen (Quail *et al.*, 2014) disertai dengan peningkatan ekspresi Vimentin. Beberapa publikasi menyebutkan kajian tentang ekspresi Vimentin dan E-cadherin yang berbanding terbalik dengan progresi kanker payudara, termasuk dengan penelusuran kondisi resistensi terhadap kemoterapi yang dihubungkan dengan keterlibatan protein CD44 dan CD24, meski batasan yang disebutkan masih sebatas peningkatan dan penurunan ekspresi belum menyebutkan batasan nilai normal dari masing-masing parameter. Secara teori, peningkatan ekspresi Vimentin, CD44 dan CD24 dan penurunan ekspresi E-cadherin menunjukkan potensi prognosis yang buruk pada kasus kanker payudara. Fakta sampai saat ini belum ada kajian tentang kombinasi keempat parameter biomolekuler tersebut untuk digunakan sebagai prediktor penyakit. Pada penelitian ini peneliti menghubungkan dengan respon kemoterapi berdasarkan ukuran diameter tumor. Fokus peneliti dalam studi ini adalah untuk digunakan

sebagai model prediktor respon kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keseluruhan faktor diskriminan (Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24) menunjukkan variasi fungsi masing-masing yang signifikan (p.value 0.000) untuk digunakan sebagai prediktor respons pasca kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal dengan nilai korelasi kanonikal sebesar 0.899. Keempat variabel bebas berkontribusi 80.82% terhadap penentuan respons terhadap kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin 3 siklus yang didapatkan dari hasil kuadrat nilai korelasi kanonikal. Vimentin merupakan prediktor respons kemoterapi paling kuat dengan nilai -0.697 , berturut-turut kemudian disusul dengan prediktor kedua CD24 (0.529), kemudian E-cadherin (0.525) dan yang paling lemah adalah CD44 dengan nilai 0.487.

Meskipun Vimentin secara statistik menunjukkan sebagai prediktor paling kuat dalam menentukan respon kemoterapi, namun jika dikaji dalam sebaran data partisipan tidak selalu peningkatan ekspresi Vimentin diatas 50% menunjukkan tidak respons terhadap kemoterapi, ada beberapa partisipan yang menunjukkan ekspresi Vimentin dibawah 50% justru memberikan respons progresif. Termasuk dengan ekspresi E-cadherin pada beberapa partisipan yang menunjukkan angka 100% justru hanya menunjukkan respon parsial, sedangkan partisipan yang menunjukkan ekspresi E-cadherin yang lebih rendah justru menunjukkan respons komplit. Variasi respons juga tampak pada hasil hitung sel ekspresi CD44, respons parsial dan respons komplit justru muncul pada partisipan dengan ekspresi CD44 yang lebih tinggi, dan hal ini justru bertentangan dengan publikasi pada jurnal sebelumnya yang menyatakan bahwa CD44 merupakan protein transmembran yang terlibat dalam inisiasi, metastatik dan agresivitas tumor (Appalaraju *et al.*, 2012). CD24 yang merupakan protein penanda sel yang lambat membelah, konsep ini banyak dikaitkan dengan resistensi kemoterapi mengingat efek obat kemoterapi lebih tepat dan akan memberikan hasil baik jika diberikan pada fase progresi tumor atau karakter sel yang cepat membelah seperti yang telah dibahas pada subbab sebelumnya. Sehingga agresivitas dan

sifat sel yang lambat membelah pada kasus kanker payudara hampir selalu dikaitkan dengan ekspresi CD44 dan CD24.

Dari penelitian ini kita ketahui bahwa ekspresi prediktor Vimentin, E-cadherin, dan CD44 mempunyai hubungan yang bermakna dengan respons kemoterapi, kecuali ekspresi CD24 yang berhubungan tidak bermakna dengan respons kemoterapi, demikian pula masing-masing prediktor mempunyai kekuatan yang tidak sama dan bervariasi. Keseluruhan konsep teori yang mendasari aktifitas masing-masing parameter yang diukur dalam penelitian ini akan berbeda bila dianalisis secara terpisah sendiri-sendiri dibandingkan bila keseluruhan parameter dikaji bersamaan dalam suatu rumus *Fisher's linear discriminant function analysis* sebagai rekonstruksi model prediktor respon kemoterapi berbasis antrasiklin seperti pada hasil penelitian ini. Nilai akurasi sebesar 97% dan sensitivitas 100% dari gabungan empat variabel yang bergabung sebagai model prediktor respon kemoterapi menunjukkan model ini sangat potensial untuk diaplikasikan secara klinis dan terbukti lebih baik dibandingkan dengan bila prediktor dianalisis secara sendiri-sendiri.

Masih menjadi pertanyaan di dalam pemahaman interaksi yang terjadi di dalam sel, diantaranya interaksi antar protein dengan protein di dalam proses penghantaran transduksi sinyal, demikian pula di dalam interaksi antar genetik di dalam karsinogenesis. Sangat dimungkinkan terdapat interaksi di dalam pensinyalan transduksi antar protein maupun interaksi genetik antara gen-gen Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24, sehingga mempunyai pengaruh yang berbeda ketika protein-protein tersebut bekerja sendiri-sendiri pada mekanisme EMT dengan bila seluruh protein marker tersebut bekerja bersama-sama dimana akan terjadi interaksi yang bisa saling berpengaruh secara keseluruhan terhadap progresifitas sel kanker payudara maupun respons terhadap kemoterapi.

Meskipun penjelasan tentang perbedaan aktifitas keempat variabel jika dikaji secara tunggal berdasarkan penelitian terdahulu dengan penggabungan ke empat variabel dalam penelitian ini masih menjadi lingkaran pertanyaan (*black box*) yang masih membutuhkan lanjutan studi dan kajian untuk melihat aktivitas keempat variabel jika digabungkan secara biomolekuler. Pendekatan *cross sectional study* yang peneliti gunakan dalam kajian ini





menjelaskan bahwa keempat variabel tidak dapat berdiri sendiri untuk menentukan respons kemoterapi melainkan saling terkait dan menunjukkan perbedaan aktifitas bila dibandingkan dengan penelusuran aktifitas masing-masing variabel secara tunggal. Secara logika ilmiah besar kemungkinan keempat protein prediktor ini ketika ada di dalam sel tubuh pasien akan terjadi interaksi genetik yang saling terkait, saling mempengaruhi, sehingga penggunaan aplikasi kombinasi parameter ekspresi Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 sebagai satu model prediktor utuh secara keseluruhan sangat bisa digunakan sebagai salah satu pedoman untuk pemberian kemoterapi neoajuvan pada kanker payudara.

Keterbatasan penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah pada jumlah sampel yang masih kurang luas, tidak meneliti semua subtipe molekular, tidak menggunakan berbagai jenis rejimen kemoterapi dan tidak dilakukan secara lebih luas multisenter di berbagai rumah sakit di seluruh wilayah Indonesia. Keterbatasan ini bisa diatasi dengan penelitian yang lebih luas dengan melibatkan berbagai jenis subtipe, berbagai macam kemoterapi, memperbanyak sampel dan dilakukan multisenter. Diharapkan ada penelitian lanjutan tentang bagaimana memeriksa biomarker sebelum dan setelah kemoterapi, sehingga dapat diketahui pada kondisi respons atau tidak respons apakah biomarker ikut berubah atau tidak.



BAB VII PENUTUP

7.1 . Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan kesimpulan yaitu:

- a. Terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi Vimentin yang rendah dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIB subtipe Luminal dengan p.value 0.000.
- b. Terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi E-cadherin yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium III subtipe Luminal dengan p.value 0.000.
- c. Terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi CD44 tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIIB subtipe Luminal dengan p.value 0.002.
- d. Terdapat hubungan yang tidak bermakna antara ekspresi CD24 yang tinggi dengan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIIB subtipe Luminal dengan p.value 0.878.
- e. Keseluruhan faktor diskriminan Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 menunjukkan variasi fungsi masing-masing yang bermakna (p.value 0.000) untuk digunakan sebagai prediktor respons terhadap kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIIB subtipe Luminal dengan nilai korelasi kanonikal sebesar 0,899. Keempat variabel bebas berkontribusi 80.82% terhadap penentuan respons kemoterapi neoajuvan berbasis antrasiklin yang didapatkan dari hasil kuadrat nilai korelasi kanonikal.
- f. Vimentin merupakan prediktor respons kemoterapi paling kuat dengan nilai -0.697, berturut-turut kemudian disusul dengan prediktor kedua adalah CD24 (0.529), E-cadherin (0.525) dan yang paling lemah adalah CD44 dengan nilai 0.487.



g. Kombinasi keseluruhan faktor diskriminan Vimentin, E-cadherin, CD44 dan CD24 sebagai satu model aplikasi yang sangat baik untuk dijadikan sebagai prediktor respons terhadap kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara stadium IIIb sub tipe Luminal.

7.2. Saran-Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka diajukan saran-saran, antara lain:

- 1 Melakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat ekspresi Vimentin, e-cadherin, CD44 dan CD24 pasca pemberian kemoterapi neoajuvan.
- 2 Mengikuti responden stadium IIIb sub tipe Luminal sampai terjadinya rekurensi akan meningkatkan nilai data dan potensi faktor prediktif yang digambarkan pada penelitian ini.
- 3 Meneliti perbandingan pengukuran berbagai sub tipe kanker payudara untuk penajaman fokus penilaian faktor prediktif respons kemoterapi dan memprediksi rekurensi yang bisa ditemukan pada kondisi pasien lebih dini.
- 4 Melakukan penelitian terhadap semua sub tipe, dengan berbagai rejimen kemoterapi yang lain, dengan jumlah sampel lebih besar dan lebih luas secara multisenter di berbagai rumah sakit di wilayah Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hajj M., Wicha MS., Benito-Hernandez A., Morrison SJ., Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100:3983–3988.
- Abraham BK., Fritz P., McClellan M. 2005. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*; 11 :1154 e 9.
- Appalaraju J., and Eyad E., 2012. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical Developmental Immunology*; 2012: 708036.
- Arun Satelli, Zachary Brownlee, Abhisek Mitra, Qing H. Meng and Shulin Li. 2015. Circulating, *Clinical Chemistry* January 2015 vol. 61 no. 1 259-266.
- Archakov AI., Govorun VM., Dubanov AV., Ivanov YD., Veselovsky AV., Lewi P. 2003. Protein–protein interactions as a target for drugs in proteomics. *Proteomics* 3(4):380–391.
- Ashworth A., Lord CJ., Reis-Filho JS. 2011. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell* 145, April. Elsevier Inc. The Breakthrough Breast Cancer Research Centre. The Institute of Cancer Research. London. UK.
- Aulmann S, Waldburger N, Penzel R. 2010. Reduction of CD44(+)/CD24(-) breast cancer cells by conventional cytotoxic chemotherapy. *Hum Pathol*; 41 :574 e 81.
- Autier, Philippe, Mathieu Boniol, and LaVecchia C. 2010. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: Retrospective Trend Analysis of WHO. Mortality Database. *BMJ: British Medical.*
- Bai-lin; Zhang, Tong SUN., Zhang Bao-ning, Zheng Shan, Ning LU., Bing-he XU., Wang Xiang, Chen Guo-ji, Dian-ke YU., and Dong-xin LIN. 2011. Polymorphisms of GSTP1 is associated with differences of chemotherapy response and toxicity in breast cancer. *124 (2): 199–204.*
- Baumann P., Cremers N., Kroese F. 2005. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis, *Cancer Research*, vol. 65, no. 23, pp. 10783–10793.
- Bauerschmitz GJ., Ranki T., Kangasniemi L. 2008. Tissue-specific promoters active in CD44+CD24-/low breast cancer cells. *Cancer Res*; 68 :5533 e 9.
- Benson JR. 2010. The TNM staging system and breast cancer. *The Lancet oncology.* Volume 4, January 2010. No. 1, p56–60.
- Bircan S., Kapucuoglu N., Baspinar S. 2006. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract*; 202 :569 e 76.



- Blows FM., Driver KE., Schmidt MK., Broeks A., van Leeuwen FE., Wesseling J. 2010. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival. *PLoS Med.*, 7: e1000279-10.1371
- Blum JL., Dieras V., Lo Russo PM., Horton J, Rutman O., Buzdar A., Osterwalder B. 2001. Multicenter, phase II study of capecitabine in taxane-pretreated metastatic breast carcinoma patients. *Cancer*; 92:1759–1768.
- Brunna, Felipe Andres Cordero da Luz, Paulo Rogério de Faria, Ana Paula Lima, Oliveira, Rogério Agenor de Araujo, and Marcelo Jose Barbosa Silva. 2014. Far beyond the usual biomarkers in breast cancer: A Review, *Journal of Cancer* 2014, 2014; 5(7): 559-571.
- Buchholz TA, Davis DW, McConkey DJ, Symmans WF, Valero V, Jhingran A, Tucker SL, Pusztai L, Cristofanilli M, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA. 2003. Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *Cancer Journal. NCBI*; Jan-Feb; 9(1):33-41.
- Bogaerts J., Ford R., Sargent D. 2009. Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria. *European Journal Cancer*; 45:248–60.
- Cao Y., Cao D., Jin M., Jia Z., Kong F., Ma H., Wang Y., Jiang J. 2014. CD44 but not CD24 expression is related to poor prognosis in non-cardia adenocarcinoma of the stomach. *BMC Gastroenterology* 2014;14:157.
- Carey, Lisa A., Charles M. Perou, Chad A. Livasy, Lynn G. Dressler, David Cowan, Kathleen Conway, Melissa A Troester. 2006. Race, breast cancer subtypes and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA: The Journal of JAMA*. 295 (21).
- Castellano I., Chiusa L., Vandone M., Beatrice S., Goia M., Donadio M., Arisio R. 2013. A Simple and reproducible prognostic index in luminal er-positive breast cancers. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 24 (9): 2292–97.
- Caudle Abigail S., Gonzalez-Angulo AM., Kelly K. Hunt, Ping Liu, Lajos Pusztai, W. Fraser Symmans, Henry M. Kuerer, Elizabeth A. Mittendorf, Gabriel N. Hortobagyi, and Funda Meric-Bernstam. 2010. Predictors of tumor progression during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (11): 1821–28.
- Chang C., Chao C., Xia W., Yang J., Xiong Y., Li C. 2011. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol.* 13 (3): 317–323.
- Cheang C., Maggie CU., Stephen K. Chia, David Voduc, Dongxia Gao, Samuel Leung, Jacqueline Snider, Mark Watson. 2009. Ki67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with Luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 101 (10): 736–50.
- Chen L., Bourguignon LY. 2014. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 13:52.



Cizmarikova M., Wagnerova M., Schonova L., Habalova V., Kohut A., Linkova A., Sarissky M., Mojzis J., Mirossay L., and Mirossay A. 2010. MDR1 polymorphism: Relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *The Pharmacogenomics Journal* 10 (1). Nature Publishing Group: 62–69.

Cleator S., Parton M., and Dowsett M. 2002. The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer; *Endocrine-Related Cancer* 9 (3): 183.

Corson TW., Gallie BL. 2006. KIF14 mRNA expression is a predictor of grade and outcome in breast cancer. *International Journal Cancer*; 119:1088–1094.

Coughlin SS., Ekwueme DU. 2009. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiology*; 33:315–318.

Creighton C., Chad J. 2012. The molecular profile of Luminal B breast cancer biologics: *Targets and Therapy* 6 (January): 289–97.

Dahlan M. Sopiudin. 2009. Besar sampel dan pengambilan sampel, dalam Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Salemba Medika.

Dancey J., Arbuck S., 2000, Cancer drugs and cancer drug development for the new millennium. In: Khayat D., Hortobagyi GN. *Progress in anti-cancer chemotherapy*, Volume IV: 91–107.

Davila E., Vogel CL. 1984. Management of locally advanced breast cancer (Stage 111): A review. *International Advanced Surgical Oncology*; 7:197-327.

Dejuan K., Li Y, Wang Z. and Fazlul H. Sarkar. 2011. Cancer stem pcells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) phenotypic cells: are they cousins or twins? *Cancers*, 3, 716-729.

Deng J., Gao G., Wang L., Wa T. 2012. Research Article. CD24 Expression as a Marker for Predicting Clinical Outcome in Human Gliomas. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 517172, 7 pages.

Dillon DA., Guidi AJ., Schnitt SJ. 2009. Pathology of invasive breast cancer. In: *Diseases of the Breast*, 4th, Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2009.

Ellen F., De Craene B, Bex G. 2010. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 12:206.

El-Mahdy MA., Zhu Q., Wang QA., Wani G. and Wani A. 2005. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells *International Journal Cancer*: 117, 409–417.

Farhad V., Lisok A., Kimble B., Raman V. 2009. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*. December; 11(12): 1.

Ferlay J, Shin HR, Bray F. 2008. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127 :2893 e 917. 2.



Fischer KR., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong, ST., Choi H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527.

Fisher B., Brown A., Mamounas E., Wieand S., Robidoux A., Margolese RG., Cruz AB. Jr., Fisher ER., Wickerham DL., Wolmark N., Decillis A., Hoehn J., Lees AW., and Dimitrov NV. 1997. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *Journal Clinical Oncology*. 15:2483-2493.

Gabriel N., Hortobagyi FC., Ames AU., Buzdar. 1988. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, Surgery, and Radiation Therapy. *Cancer*. 62:2507-2516.

Genevieve R, Liwski RS., Marc Mansour M.. 2011. Immune modulation by chemotherapy or immunotherapy to enhance cancer vaccines. *Cancers*. 3, 3114-3142.

Ghuwalewala S., Ghatak D., Das P., Dey S., Sarkar S., Alam N., Panda CK., Roychoudhury. 2016. SCD44(high)CD24(low) molecular signature determines the cancer stem cell and EMT phenotype in oral squamous cell carcinoma. *Stem Cell Res*. Mar; 16(2):405-17.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A. 2011. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol*; 28 :745 e 52.

Goldrisc A., Wood W., Coates A., Gelber R., Tjhurliman B., Sen HJ. 2011. Strategies for subtype dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncology*. Mdr 304.

Gonen M., Heller G. 2007. Concordance probability and discriminatory power in proportional hazards regression. *Biometrika*; 92: 965–970.

Gong S., Yoon G., Jang I., Bolser D., Dafas P., Schroeder M. 2005. PSibase: a database of Protein Structural Interactome map (PSIMAP). *Bioinformatics* 21(10):2541–2543.

Gong S., Sungsam P., Changbun, Hansol C., Ko J., Junsu J., Insoo J., Jungsul L., Bolser D., Oh D., Kim DS., Bhak J. 2005. A Protein domain interaction interface database: InterPare. *BMC Bioinformatics Vol .6*: 207.

Hamilton A., and Piccart M. 2000. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A Review of the Literature on HER-2, p53 and BCL-2, *Annals of Oncology* 11: 647–63.

Hannun YA. 1997. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy, *The Journal of The American Society of Hematology*. 89: 1845-53.

Hanxiao X., Yijun T., Xun Y., Yu L., Hua W., Qian L., Gen Sheng W., and Kongming W. 2016. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis *Onco Targets Therapy*. 2016; 9: 431–444.

Heatley MK., Ewings P., Odling Smee W., Maxwell P. 2002. Vimentin expression does not assist in predicting survival in ductal carcinoma of the breast. *Pathology*; 34(3):230-2.



Hirata, Bruna Karina Banin, Julie Massayo Maeda Oda, Roberta Losi Guembarovski, Carolina Batista Ariza, Carlos Eduardo Coral de Oliveira, and Maria Angelica Ehara Watanabe. 2014. Molecular markers for breast cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Disease Markers*.

Honeth G., Bendahl PO., Ringner M. 2008. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*; 10 :R53.

Howard ME., Lau KS., Lyles HR., Birdsong GG., Umbreit JN., Kochhar R. 2005. Expression of e-cadherin in high-risk breast cancer, *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(1):14–18.

Inthrani R., Grégory Tufo, Shazib Pervaiz, and Catherine Brenner. 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807 (6). Elsevier B.V. 735.

Jacobs WB., Govoni G., Ho D., Atwal JK., Barnabe-Heider F., Keyes WM., Mills AA., Miller FD., Kaplan DR. 2005. P53 is an essential proapoptotic protein during neural development. *Neuron*; 48:743–756.

Jiang WG., Mansel RE., 2000. E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer, *Surg Oncol*, 2000, 9(4):151–171.

Jin J., Krishnamachary B., Mironchik Y., Kobayashi H., Bhujwala ZM.. 2016. Phototheranostics of CD44-positive cell populations in triple negative breast cancer. *Scientific reports* 6, 27871.

Johnstone RW., et.al. 2002. Apoptosis: A link reviewbetween cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108: 153–164.

Jun Yokota. 2000. Tumor progression and metastasis, *Carcinogenesis* (2000) 21 (3): 497-503.

Jung, So-Youn, Junsoo Jeong, Seung-Ho Shin, Youngmee Kwon, Eun-A Kim, Kyoung Lan Ko, Kyung Hwan Shin. 2010. The invasive lobular carcinoma as a prototype Luminal A breast cancer: A Retrospective Cohort Study. *BMC Cancer* 10 (1). BioMed Central Ltd: 664.

Kajiyama H., Shibata K., Terauchi M., Yamashita M., Ino K., Nawa A., Kikkawa F. 2007. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol*. 31: 277–283.

Kalluri. 2009. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 119 Number 6 June. *J. Clin. Invest.* 119: 1417–1419.

Kalluri R., Weinberg RA. 2009. *Journal of Clinical Investigation*. 119 (6): 1420–1428

Kamath K., Wilson L., Cabral F., Jordan MA. 2005. III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *Journal Biological Chemistry*; 280:12902–12907.



Kami ska K., Szczylik C., Bielecka ZF., Bartnik E., Porta C., Lian F., Czarnecka AM. 2015. The role of the cell-cell interactions in cancer progression, *Journal Cell Molecular Medicine*. Feb; 19(2): 283–296.

Kaufmann P., Dauphine CE., Vargas MP., Burla M.L., Isaac NM., Gonzalez KD., Rosing D. 2006. Success of neoadjuvant chemotherapy in conversion of mastectomy to breast conservation surgery. *AmSurg*;72(10):935-8

Kemenkes RI. 2015. Informasi Kementerian Kesehatan RI Info DATIN, <http://www.depkes.go.id>.

Kemenkes. 2013. Profil Kesehatan Indonesia 2012, Jakarta, Profil Kesehatan 2012 (4 Sept 2013).

Kent WH, Nigel PS., Alsarraj J. 2008. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research* 2008, 10 (Suppl 1):S2.

Khokher S., Saqib M., Qureshi MU., Khan SA., and Chaudhry NA. 2011. An initial clinical response to neoadjuvant chemotherapy: an in-vivo chemosensitivity test for efficacy in patients with advanced breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 12 (4): 939–46.

Kim S., Joohyuk S., Ja Seung Koo, Se Ho Park, Hyung Seok Park, and Byeong Woo Park. 2010. *Molecular Oncology* 79 (5-6): 324–30.

Kovalchuk O., Filkowski J., Meservy J., Ilnytsky Y., Tryndyak VP. 2008 Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Molecular Cancer Therapy* 7(7): 2152–2159.

Kowalski PJ., Rubin MA., Kleer CG. 2003. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases, *Breast Cancer Res*, 5(6):R217–R222.

Koya S., Li Y., McDaniel SA. 2009. Safety and effectiveness of dose dense neoadjuvant chemotherapy in patients with stage II/III breast cancer. *Journal Clinical Oncology*; 27(15S):e11566.

Kresno SB. 2012. *Ilmu Dasar Onkologi*. 3 ed. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.

Kratz F., Ehling G., Kauffmann HM., and Unger C. 2007. Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6-maleimidocaproyl) hydrazone derivative of doxorubicin (doxo-emch), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin. *Human and Experimental Toxicology* 26 (1): 19–35.

Kusinska RU., Kordek R., Pluciennik E., Bednarek AK, Piekarski JH., Potemski P. 2009. Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'? *J Expl Clin Cancer Res*. Aug 20; 28: 118.

Lacroix M., Toillon RA. and Leclercq G. 2006. Review article: p53 and breast cancer, an update *Endocrine-Related Cancer* 13 293–325.

Lamouille S., Xu J, Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15 (3): 178–196.



- Lee. 2011. Tumor-Associated Macrophage: Its role in tumor angiogenesis, *Journal of Cancer molecules* 2(4): 135-140.
- Li, Linna; Li, Wenliang. 2015. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacology and Therapeutics*. 150: 33–46
- Li P., Lu X., Wang Y., Sun L., Qian C. 2010. MiR-181b suppresses proliferation of and reduces chemoresistance to temozolomide in U87 glioma stem cells. *Journal Biomedical Researches* 24: 436–443.
- Li Q.; Xu J.; Wang W.; Cao X., Chen Q., Tang F., Chen ZQ., Liu XP., Xu ZD. 2009. Twist1-mediated Adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 2657–2665.
- Lim E., and Eric PW. 2011. Adjuvant chemotherapy in luminal breast cancers, *Breast (Edinburgh, Scotland)* 20 Supplement 3 (October): S128–31.
- Lo and Yu-Li. 2013. A potential daidzein derivative enhances cytotoxicity of epirubicin on human colon adenocarcinoma caco-2 cells, *International Journal Molecular Science*, 14, 158-176.
- Loibl S., Gunter von Minckwitz, Günther R., Jens-Uwe., Serban DC., Bernd G., Eidtmann H. 2006. Surgical procedures after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer: Results of the GEPARUO Trial, *Annals of Surgical Oncology* 13 (11): 1434–42.
- Longley DB., Johnston PG. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*; 205:275–292.
- Lu P., Kumar S., Brown S., Kannappan V., Tawari PE., Tang JZ. 2013. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquires paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells. *British J Cancer*; 110: 1876-1885.
- Luo M., Lu Z., He S., Yuan K., Zhang G., Meng S., Wang F. 2010. nuclear entry of active caspase-3 is facilitated by its p3-recognition-based specific cleavage activity, *Cell Research* 20 (2). Nature Publishing Group: 211–22.
- Lwanga SK. and Lemeshow S. 1991. Sample size determination in health studies: A Practical Manual, WHO, Organisation Mondiale de la Sante.
- Mani SA., Guo W., Liao MJ., Eaton EN., Ayyana A., Zhou AY., Brooks M., Reinhard F., Zhang CC., Shipitsin M. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, 133, 704–715.
- Manuaba IBT. 2010. Panduan penatalaksanaan kanker solid. PERABOI 2010, Jakarta, Sagung Seto.
- Michael KW., Nikolas B., Cathleen RC. William P. Schiemann. 2014. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas *JAKSTAT*. 2014; 3(2): 123.
- Miller K., Wang M., Gralow J. 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *North England Journal Medicine*; 357: 2666–2676.



Mima K., Hayashi H., Imai K., Kuroki H., Nakagawa S., Okabe H., Chikamoto A., Watanabe M., Beppu T., Baba H. 2013. High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy, *J Hepatobiliary Pancreatic Sciences*. Apr; 20(4): 429-34.

Mitchell. 2013. Diverse mechanism of AKT pathway activation in human malignancy, *Curr Cancer Drug Target*, 13: 234.

Mommers EC., van Diest PJ., Leonhart AM., Meijer CJ., and Baak JP. 1999. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis, *Breast Cancer Research and Treatment* 58 (2): 163–69.

Mondesire WH., Jian W., Zhang H., Ensor J., Hung MC., Mills GB., Meric-Bernstam F. 2004. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*; 10:7031–7042.

Mylona E., Giannopoulou I., Fasomytakis E. 2008. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*; 39 :1096 e 102.

Nguyen, Paula D. Bos and Joan Massagué. 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization, *Don Nature Reviews. Cancer* Volume 9. April: 283.

Nofech-Mozes S., Trudeau M., Kahn HK. 2009. Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treatment*; 118:131–137.

Nowak AK., Robinson BW., Lake RA. 2003. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Research*; 63:4490–6.

Oliveras-Ferraros C., Corominas-Faja B., Cufi S., Vazquez-Martin A., Martin-Castillo B., Iglesias JM., López-Bonet E., Martin AG., Menendez JA. 2012. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*, 11, 4020–4032.

Parker JS., Michael M., Maggie CU., Samuel L., David V., Tammi V., Sherri D. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (8): 1160–67.

Pasquier J., Abu-Kaoud N., Al Thani H., and Rafii A. 2010. Review Article. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective. *Journal of Oncology*. Article ID 792182, 10 pages.

Perou CM., Sorlie T., Eisen MB. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406 :747 e 52. 3.

Puisieux A., Brabletz T., Caramel J. 2014. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*. 16 (6): 488–494.



Qureshi HS., Linden MD., Divine G., Raju UB. 2006. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters, *Am J Clin Pathol*, 125(3):377–385.

Quail and Joyce JA.. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and Metastasis DF, Published in final edited form as: *National Medicine*. November; 19(11): 1423–1437.

Rakha EA., Jorge S., Frederick B., David JD., Decker T., Eusebi V., Stephen B., Fox SB. 2010. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research: BCR* 12 (4): 207–18.

Rebecca L., Siegel K., Mille KD., Jemal A. 2017. Cancer statistics, 2017. CA: A cancer journal for clinicians. American American Cancer Society.

Repetto O., De Paoli P., De Re V., Canzonieri V., and Cannizzaro R. 2014. Review article levels of soluble e-cadherin in breast, gastric, and colorectal cancers, *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* Volume. Article ID 408047.

Reynolds C., Damerel D., Susan J. 2008. ProtorP: a protein-protein interaction analysis server. *Oxford Journal of Bioinformatics* Vol 25 no 50: 413-414.

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Badan Litbangkes). Kementerian Kesehatan RI.

Saito S., Okabe H., Watanabe M., Ishimoto T., Iwatsuki M., Baba Y., Tanaka Y., Kurashige J., Miyamoto Y., Baba H. 2013. CD44 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep*. Apr; 29(4):1570-8.

Salwinski L., Miller CS., Smith AJ., Pettit FK., Bowie JU., Eisenberg D. 2004. The Database of Interacting Proteins: 2004 update. *Nucleic Acids Res* 32(Database issue):D449–D451.

Samatov. 2013. Epithelial- mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Molecular cancers* 12: 107.

Sardanelli F., Boetes C., Borisch B., Decker T., Federico M., Gilbert FJ., Helbich T., Heywang-Köbrunner SH., Kaiser WA. and Kerin MJ. 2010. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *European journal of cancer*, 46, 1296-1316.

Sastroasmoro, Sudigdo, dan Ismael, Sofyan, 1995, *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. Jakarta: Binarupa Aksara.

Satelli A., Li S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Sep;68(18):3033-46.

Schabath H., Runz S., Joumaa S., and Altevogt P.. 2006. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells, *Journal of Cell Science*, vol. 119, no. 2, pp. 314–325, 2006.

Schostak M., Krause H., Miller K., Schrader M., Weikert S., Christoph F. 2006. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. *BMC Urology*; 6:7.



Schwartz GF., Hortabagi GN. 2004. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast. Philadelphia, Pennsylvania. 2004. pp. 2512–32.

Shien, Tadahiko, Sadako Akashi-Tanaka, Kuniyoshi Miyakawa, Takashi Hojo, Chikako Shimizu, Kuniyoshi Seki, Masashi Ando. 2009. Clinicopathological features of tumors as predictors of the efficacy of primary neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *World Journal of Surgery* 33 (1): 44–51.

Shmelkov SV., Butler JM., Hooper AT., Hormigo A., Kushner J., Milde T., St Clair R., Baljevic M., White I., Jin DK., Chadburn A., Murphy AJ., Valenzuela DM., Gale NW., Thurston G., Yancopoulos GD., D'Angelica M., Kemeny N., Lyden D., Rafii S. 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. 118 (6): 2111–20.

Slezak F., D. Soares C., Cecchi G.A., Marshall G., Stolovitzky G. 2010. When the optimal is not the best parameter estimation in complex Biological Model *Plos ONE* 5 (10).

Smith IE., Walsh G., Jones A., Prendiville J., Johnston S., Gusterson B., Ramage F., Robertshaw H., Sacks N., Ebbs S. 1995. High complete remission rates with primary neoadjuvant infusional chemotherapy for large early breast cancer. *Journal Clinical Oncology*, 13: 424-429.

Snyder EL., Bailey D., Shipitsin M. 2009. Identification of CD44v6(+)/CD24- breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies. *Lab Invest*; 89 :857 e 66.

Sorlie T., Tibshirani R., Parker J. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceeding National Academic Sciences USA.*; 100(14):8418-8423.

Sotiriou C., Neo SY., McShane LM. 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100 :10393 e 8.

Suciu C., Cîmpean AM., Muresan AM., Izvernariu D., Raica M.. 2008. Original Paper: E-cadherin expression in invasive breast cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 49(4):517–523.

Suciu L, Popescu LM, Gherghiceanu M, Regalia T, Nicolescu MI, Hinescu ME, Fausone-Pellegrini M-S. 2010. Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs*; 192:325–39.

Sulpizi M., Rothlisberger U., and Carloni P. 2003. Molecular Dynamics Studies of Caspase-3, *Biophysical Journal* 84 (4): 2207–15.

Tawa P., Hell K., Giroux E., Grimm, Han Y., Nicholson W., and Xanthoudakis S. 2004. Catalytic activity of caspase-3 is required for its degradation: stabilization of the active complex by synthetic inhibitors, *Cell Death and Differentiation* 11 (4): 439–47.

Thiery JP., Sleeman JP. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7: 131–142.



Thiery JP., Acloque H., Huang YJ., Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease". *Cell*. 139 (5): 871–890.

Tian XJ., Zhang H., Xing J. 2013. Coupled reversible and irreversible bistable switches underlying TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Biophys. J.* 105 (4): 1079–89

Tischler J., Lehner B., and Fraser AG. 2008. Evolutionary plasticity of genetic interaction networks. *National Genetic*. 40, 390–391.

Tonini G., Fratto ME., and Gaia Schiavon. 2008. Molecular Prognostic Factors: Clinical implications in patients with breast cancer, *Cancer Therapy* 6: 773–82.

Vallejos CS., Henry L. Gómez, Wilder R. Cruz, Joseph A. Pinto, Richard R. Dyer, Raúl Velarde, Juan F. Suaso, Silvia P. Neciosup, Mauricio León, Miguel A. de la Cruz, Carlos E. Vigi. 2010. Breast cancer classification according to immunohistochemistry subtype an association with clinicopathologic variables in a Peruvian Hospital data base. *Clinical Breast Cancer*, Vol. 10, No.4. 294 -300.

Wahidin M. 2012. Population-based cancer registration in Indonesia. *Asian Pacific Journal Cancer Preview*, 13, 1709-10

Wang H., Tan G., Dong L., Cheng L., Li K. 2012. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One* 7: e34210.

Wei W., Hui H., Tan H., Louis WC. Chow, Adrian YS. Yip, and Wings TY. Loo. 2012. Relationship of CD44/CD24^{low} breast cancer stem cells and axillary lymph node metastasis, *Journal Transl Medicine*. 2012; 10.

West DC. and McGrowder DA. 2011. Triple negative breast cancer: therapeutic and prognostic implications. *Asian Pacific Journal Cancer Prev*; 12: 2129-2133.

Wu J., Li S., Jia W., Su F. 2011. Response and prognosis of taxanes and anthracyclines neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Journal Cancer Research Clinical Oncology* 137 (10): 1505–10.

Yang J., Weinberg RA. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 14 (6): 818–829.

Yokota. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. Oxford journals. *Carcinogenesis* 21 (3): 497-503.

Zheng, Xiaofeng; Carstens, Julienne L.; Kim, Jiha; Scheible, Matthew; Kaye, Judith; Sugimoto, Hikaru; Wu, Chia-Chin; LeBleu, Valerie S.; Kalluri, Raghu. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 527 (7579): 525–530.

Zhou P., Li B., Liu F., Zhang M., Wang Q., Liu Y., Yuan Yao, and Dong Li. 2017. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Molecular cancer*. BioMed central.

Zhou BP., Li J. 2011. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*; 11:49.

