

**KARYA AKHIR**

***THE CORRELATION BETWEEN EXPRESSION OF FOXP3 T  
REGULATOR (TREG) LYMPHOCYTE AND TUMOUR-  
INFILTRATING LYMPHOCYTES (TILS) DEGREE IN INVASIVE  
BREAST CARCINOMA***

**HUBUNGAN EKSPRESI FOXP3 LIMFOSIT T REGULATOR  
(TREG) DENGAN DERAJAT TUMOUR-INFILTRATING  
LYMPHOCYTES (TILS) PADA KARSINOMA PAYUDARA  
INVASIF**



**RAHMIANY SYAM**

**C107216203**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)  
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**HUBUNGAN EKSPRESI FOXP3 LIMFOSIT T REGULATOR  
(TREG) DENGAN DERAJAT TUMOUR-INFILTRATING  
LYMPHOCYTES (TILS) PADA KARSINOMA PAYUDARA  
INVASIF**

**Karya Akhir**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis  
Patologi Anatomi

Disusun dan Diajukan Oleh

**RAHMIANY SYAM  
C 107216203**

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)  
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

## LEMBAR PENGESAHAN

### KARYA AKHIR

#### HUBUNGAN EKSPRESI FOXP3 LIMFOSIT T REGULATOR (TREG) DENGAN DERAJAT TUMOUR-INFILTRATING LYMPHOCYTES (TILS) PADA KARSINOMA PAYUDARA INVASIF

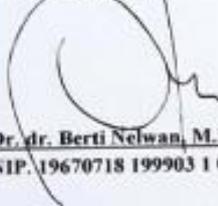
Disusun dan diajukan oleh :

**dr. Rahmiyany Syam**  
C107 216 203

Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis  
Program Studi Ilmu Patologi Anatomi  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 10 September 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

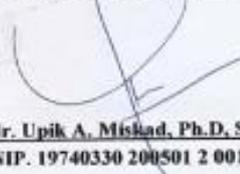
#### Menyetujui

Pembimbing Utama



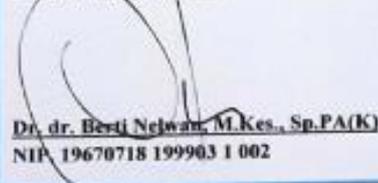
Dr. dr. Berti Nelwan, M.Kes., Sp.PA(K)  
NIP. 19670718 199903 1 002

Pembimbing Pendamping



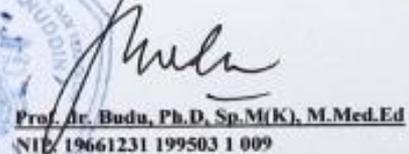
dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)  
NIP. 19740330 200501 2 001

Ketua Program Studi  
Ilmu Patologi Anatomi



Dr. dr. Berti Nelwan, M.Kes., Sp.PA(K)  
NIP. 19670718 199903 1 002

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed  
NIP. 19661231 199503 1 009



## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

### PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

NAMA : RAHMIANY SYAM

NIM : C 107 216 203

PROGRAM STUDI : PPDS ILMU PATOLOGI ANATOMI FAKULTAS  
KEDOKTERAN UNHAS

Menyatakan dengan sebenarnya, bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 10 September 2021  
Yang menyatakan,



RAHMIANY SYAM

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamin, kami panjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkah dan rahmat-Nya, sehingga karya akhir ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulisan karya akhir ini merupakan salah satu syarat penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Ilmu Patologi Anatomi di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Dalam penelitian dan penulisan karya akhir ini, penulis mendapat sangat banyak bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. **Dr. dr. Berti Julian Nelwan, M.Kes., Sp.PA(K)** sebagai pembimbing pertama dan ketua bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar atas segala bantuan, bimbingan, dan dorongannya dalam menyelesaikan penyusunan karya akhir ini.
2. **dr. Upik A. Miskad, PhD., Sp.PA (K)** sebagai pembimbing kedua dan ketua Program Studi Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar dalam penelitian ini, yang membimbing dan mendorong penulis hingga penyusunan karya akhir dapat terselesaikan dengan baik.
3. **Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM** sebagai pembimbing statistik dalam penelitian ini, yang membimbing dan membantu penulis dalam metodologi penelitian dan analisis statistik karya akhir ini.
4. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta didik pada Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Ilmu Patologi Anatomi Universitas Hasanuddin Makassar.
5. Koordinator Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Universitas Hasanuddin yang senantiasa memantau dan membantu kelancaran pendidikan penulis.
6. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia atas bantuan dana

pendidikan melalui beasiswa Program Pendidikan Dokter Spesialis Berbasis Kompetensi sejak tahun 2017 sampai saat ini.

7. Seluruh staf pengajar di bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin tanpa terkecuali (khususnya **Prof. dr. Syarifuddin Wahid, Ph.D, SpPA(K), dr. Gunawan Arsyadi, SpPA(K), Prof. Dr. dr. Johanna M. Kandouw, SpPA(K), dr. Truly D. Djimahit, Sp.PA(K), dr. Cahyono Kaelan, Ph.D., SpPA(K), SpS., dr. Djumadi Achmad, Sp.PA(K), dr. Mahmud Ghaznawie, Ph.D., SpPA(K), dr. Ni Ketut Sungowati, SpPA(K), Dr. dr. Gatot S. Lawrence, SpPA(K), FESC., dr. Upik A. Miskad, Ph.D, SpPA(K), dan dr. Muhammad Husni Cangara, Ph.D, SpPA**) atas bimbingan selama penulis menjalani pendidikan maupun dalam penyusunan karya akhir ini.
8. Teman-teman sejawat residen Patologi Anatomi atas semua bantuan, dukungan, doa, dan persaudaraan yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan hingga menyelesaikan karya akhir ini.
9. Seluruh teknisi dan pegawai laboratorium Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, Laboratorium Sentra Diagnostik Patologia Makassar, dan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.
10. Suami, **Rakhmat Hidayat**, anak-anak tercinta kami **Andi Muhammad Rasya Al Islam, Andi Muhammad Nabil Al Faiz, Andi Muhammad Danish Al Khairy dan Andi Muhammad Zaydan Ar Rizqy**, orang tua kami, beserta seluruh keluarga dan sahabat yang telah menjadi pemberi semangat terbesar bagi penulis selama menjalani pendidikan.
11. Semua pihak yang telah membantu penulis, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis berharap semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu patologi anatomi di masa yang akan datang. Akhir kata, penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya atas segala khilaf mulai dari awal penelitian sampai akhir penulisan tesis ini.

Wassalam,

Makassar, 10 September 2021

Rahmiany Syam

## ABSTRAK

**Rahmiany Syam, Berti J. Nelwan, Upik A.Miskad, Andi Alfian Z, Gunawan Arsyadi, Ni Ketut Sungowati.** Hubungan *Ekspresi FOXP3 Limfosit T Regulator (TREG) dengan Derajat Tumour-Infiltrating Lymphocytes (Tils) Pada Karsinoma Payudara Invasif.*

**Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk menilai hubungan ekspresi FOXP3 limfosit TReg dengan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif.

**Metode:** Metode yang digunakan adalah penelitian observasi analitik dengan desain *Cross Sectional*. Sampel penelitian terdiri dari 83 sediaan blok parafin, berasal dari reseksi jaringan payudara dengan diagnosa karsinoma payudara invasif yang dilakukan pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Kemudian diwarnai dengan pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal FOXP3 dengan dilusi 1:100. Kami menganalisis hubungan antara FOXP3 limfosit Treg dan derajat TILs dengan grading histopatologi, selain itu kami juga menilai hubungan antara ekspresi FOXP3 limfosit Treg dengan derajat TILs. Hasil yang diperoleh, kemudian diuji secara statistik dengan Uji Chi-Square.

**Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara derajat *tumour-infiltrating lymphocytes* (TILs) dan ekspresi FOXP3 limfosit Treg terhadap derajat *diferensiasi* karsinoma payudara invasif dengan nilai  $p < 0,001$ . Terdapat pula hubungan yang bermakna antara ekspresi FOXP3 limfosit Treg dengan derajat TILs ( $p < 0,001$ ).

**Kesimpulan:** Overekspresi FOXP3 Treg lebih banyak terdapat pada karsinoma payudara invasif diferensiasi buruk dengan derajat TILs yang lebih rendah.

**Kata kunci:** FOXP3 limfosit TReg, Derajat TILs, Karsinoma Payudara Invasif.

## **ABSTRACT**

**Rahmiany Syam, Berti J. Nelwan, Upik A.Miskad, Andi Alfian Z, Gunawan Arsyadi, Ni Ketut Sungowati..** *The Correlation Between Expression of FOXP3 T Regulator (TREG) Lymphocyte and Tumour-Infiltrating Lymphocyte (TILs) Degree in Invasive Breast carcinoma.*

**Objective:** This study aims to evaluate correlation between expression of FOXP3 TReg lymphocytes and the degree of TILs in invasive breast carcinoma.

**Methods:** The method used is an analytical observation study with a cross sectional design. Paraffin-embedded tissue of 83 patients of invasive breast carcinoma were evaluated and classified based on histopathology grading which was stained with Hematoxylin-Eosin. All of the samples were stained by immunohistochemistry with monoclonal antibody of concentrated FOXP3 with a dilution of 1:100. We analyzed the correlation between expression of FOXP3 Treg lymphocytes and the degree of TILs with histopathological grading, in addition we also assessed the correlation between expression of FOXP3 Treg lymphocytes and the degree of TILs. The results were then statistically examined using Chi-square tests.

**Results:** The results showed that there was a significant difference between the degree of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and the expression of FOXP3 Treg lymphocytes on the degree of differentiation of invasive breast carcinoma with p value of each  $p < 0.001$ . There was also a significant correlation between Treg lymphocyte FOXP3 expression and the degree of TILs ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** FOXP3 Treg overexpression was more prevalent in poorly differentiated invasive breast carcinomas with lower TILs.

**Keywords :** FOXP3 T Regulator (TREG) Lymphocyte, Tumour-Infiltrating Lymphocyte (TILs) Degree, Invasive Breast carcinoma.

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang.....	1
I.2. Rumusan Masalah .....	5
I.3. Tujuan Penelitian .....	5
I.3.1. Tujuan Umum .....	5
I.3.2. Tujuan Khusus .....	5
I.4. Hipotesis.....	6
I.5. Manfaat Penelitian .....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
II.1. Anatomi dan Histologi Payudara .....	8
II.2. Karsinoma Payudara .....	9
II.2.1. Definisi Karsinoma Payudara .....	9
II.2.2. Faktor Risiko Karsinoma Payudara .....	10
II.2.3. Karsinogenesis Karsinoma Payudara .....	13
II.2.4. Karsinoma Payudara Invasif Tanpa Tipe Tertentu .....	17
II.2.5. Sistem Grading Karsinoma Payudara Invasif .....	19
II.2.6. Subtipe Karsinoma Payudara.....	21
II. 3. Faktor Prognostik dan Prediktif Kanker Payudara.....	22
II.4. Aspek Immunologi Tumor .....	25
II.4.1. Antigen Tumor .....	25

II.4.2. Respon imun terhadap tumor .....	29
II.4.3. Tumour-Infiltrating Lymphocytes (TILs) .....	36
II.4.4. Limfosit T Regulator (FOXP3) .....	37
II.4.5. TILs dan FOXP3 T Regulator Pada Karsinoma Payudara .....	40
II.5. Kerangka Teori .....	43
<b>BAB III KERANGKA KONSEP .....</b>	<b>44</b>
III.1. Identifikasi Variabel .....	44
III.2. Klasifikasi Variabel .....	44
III.3 Kerangka Konsep .....	45
<b>BAB IV METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>46</b>
IV.1. Desain Penelitian .....	46
IV.2. Tempat dan Waktu Penelitian .....	46
IV.3. Populasi Penelitian .....	46
IV.4. Sampel dan Cara Pengambilan Sampel .....	46
IV.5. Perkiraan Besar Sampel .....	47
IV.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi .....	47
IV.6.1. Kriteria Inklusi .....	47
IV.6.2. Kriteria Eksklusi .....	48
IV.7. Cara Kerja .....	48
IV.7.1. Alokasi Subyek .....	48
IV.7.2. Prosedur pewarnaan Hematoxylin Eosin .....	49
IV.7.3. Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia .....	50
IV.8. Defenisi Operasional dan Kriteria Obyektif .....	52
IV.8.1. Defenisi Operasional .....	52
IV.8.2. Kriteria Obyektif .....	53
IV.9. Pengolahan dan Analisa Data .....	56
IV.10. Alur Penelitian .....	58
IV.11. Personalia Penelitian .....	58
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>59</b>
V.1 Hasil Penelitian .....	59
V.1.1 Jumlah Sampel .....	59

V.1.2 Karakteristik Sampel.....	65
V.1.3 Analisis Perbedaan Derajat TILs Berdasarkan <i>Grade</i> Histopatologi.....	66
V.1.4 Analisis Perbedaan Ekspresi FOXP3 Treg Berdasarkan <i>Grade</i> Histopatologi.....	67
V.1.5 Analisis Hubungan Ekspresi FOXP3 Treg dengan Derajat TILs.....	68
V.2. Pembahasan .....	69
V.2.1. Karakteristik Sampel Penelitian .....	69
V.2.2. Perbedaan Derajat TILs Berdasarkan <i>Grade</i> Histopatologi ....	69
V.2.3 Perbedaan Ekspresi FOXP3 Limfosit T regulator (Treg) Berdasarkan <i>Grade</i> Histopatologi .....	71
V.2.4 Hubungan Ekspresi FOXP3 Limfosit T regulator (Treg) dengan Derajat TILs .....	74
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	76
VI.1 Kesimpulan.....	76
VI. 2 Saran.....	76
DAFTAR PUSTAKA.....	78

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Grading karsinoma payudara dengan metode semikuantitatif hasil modifikasi Elston & Ellis	20
Tabel 2: Stadium kanker payudara berdasarkan <i>American Joint Committee on Cancer (AJCC)</i> edisi 7 tahun 2010	24
Tabel 3. Subtipe molekuler kanker payudara disertai komponen prognostik dan prediktifnya	25
Tabel 4. Karakteristik sampel	65
Tabel 5. Derajat TILs berdasarkan <i>grade</i> histopatologi	66
Tabel 6. Ekspresi FOXP3 Treg berdasarkan <i>grade</i> histopatologi	67
Tabel 7. Ekspresi FOXP3 Treg dengan derajat TILs	68

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur payudara secara skematik dan mikroskopik	9
Gambar 2. Jalur utama perkembangan kanker payudara	16
Gambar 3. Gambaran histopatologi	20
Gambar 4. Fase Eliminasi sebagaimana yang dipaparkan oleh uraian di atas. Sel tumor berwarna biru, sel normal yang belum bertransformasi berwarna abu-abu	32
Gambar 5. Tiga fase ' <i>cancer immunoediting</i> ' terdiri dari fase <i>elimination</i> , <i>equilibrium</i> , dan <i>escape</i> .	36
Gambar 6. Sel T regulator terakumulasi di lingkungan tumor tempat mereka mengatur tumor imun <i>escape</i> .	38
Gambar 7. Interaksi antara lingkungan mikro imun dan sel tumor pada kanker payudara	40
Gambar 8. Pendekatan Standar untuk evaluasi TILs pada karsinoma payudara	52
Gambar 9. Standarisasi dan pedoman untuk penilaian TILs.	52
Gambar 10. Karsinoma payudara invasif <i>Grade 1</i> (diferensiasi baik)	60
Gambar 11. Karsinoma payudara invasif <i>Grade 2</i> (diferensiasi sedang)	60
Gambar 12. Karsinoma payudara invasif <i>Grade 3</i> (diferensiasi buruk)	60
Gambar 13. TILs ringan.	61
Gambar 14. TILs sedang.	62
Gambar 15. TILs berat.	62
Gambar 16. Ekspresi FOXP3 limfosit Treg negatif/rendah	63
Gambar 17. Ekspresi FOXP3 limfosit Treg positif rendah	63
Gambar 18. Ekspresi FOXP3 limfosit Treg positif tinggi	64

## DAFTAR SINGKATAN

APC	: Antigen Presenting Cell
BRCA	: Breast Cancer gene
CCL-2	: Chemokine ligand-2
CD	: Cluster of Differentiation
CTL	: Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	: Cytotoxic T lymphocyte-associated protein
DC	: Dendritic Cells
DCIS	: Ductal Carcinoma In Situ
DFS	: Disease Free Survival
ER	: Estrogen Receptor
FOXP3	: Forkhead box Protein 3
GZB	: Granzyme B
H.E.	: Hematoxylin Eosin
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IDO	: Indolamine 2,3-dioxygenase
IFN- $\gamma$	: Interferon-gamma
IL	: Interleukin
M1/M1 TAM	: Tumor-Associated Macrophage
MDSC	: Myeloid-Derived Suppressor Cell
MHC	: Major Histocompatibility Complex
NKT	: Natural Killer T-cell
PD-1	: Programmed Death-1
PDL-1	: Programmed Death Ligand-1
PR	: Progesterone Receptor
PI3K	: Phosphoinositide-3 Kinase
ROS	: Reactive Oxygen Species
TAA	: Tumor-Associated Antigen

TCR	: T-cell receptor
TDLU	: Terminal Duct-Lobular Unit
Teff	: T effector cell
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor Beta
TILs	: Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TME	: Tumor Microenvironment
TNF $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor Alpha
TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	: T regulatory cell

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **I.1. Latar Belakang**

Karsinoma payudara adalah kanker yang paling sering didiagnosa dan merupakan penyebab kematian tertinggi akibat kanker pada wanita di seluruh dunia (Torre, 2015). Data Global Cancer Observatory 2018 dari World Health Organization (WHO) menunjukkan kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker payudara, yakni 58.256 kasus atau 16,7% dari total 348.809 kasus kanker. Kementerian Kesehatan menyatakan, angka karsinoma payudara di Indonesia mencapai 42,1 orang per 100 ribu penduduk. Rata-rata kematian akibat karsinoma ini mencapai 17 orang per 100 ribu penduduk. (WHO,2019; [www.depkes.go.id](http://www.depkes.go.id)). Angka kejadian karsinoma payudara pada wanita di Indonesia mengalami peningkatan dari tahun ke tahun (Suyatno, 2009). Di Makassar sendiri kasus kanker payudara menunjukkan peningkatan jumlah kasus yang cukup signifikan. Hal ini dapat dilihat dari adanya peningkatan jumlah kasus kanker payudara yang tercatat di Laboratorium Sentra Diagnostik Patologia Makassar (SDPM) yang cukup tinggi dari tahun ke tahun. Pada tahun 2017 tercatat 273 kasus, tahun 2018 tercatat 259 kasus, dan pada tahun 2019 tercatat sebanyak 352 kasus. (Data mentah dari Laboratorium SDPM).

Karsinoma payudara invasif merupakan bentuk yang paling umum dari karsinoma payudara, sekitar 80% dari semua kanker payudara adalah karsinoma duktal invasif (Breast cancer fact & figure 2017-2018).

Karsinoma payudara invasif secara rutin di-*grading* berdasarkan bentuk kelenjar, pleomorfisme inti, dan jumlah mitosis. Penentuan grading histopatologi secara objektif dengan menggunakan metode *Patey & Scarff*, dan *Bloom & Richardson* yang dimodifikasi oleh Elston & Ellis. Grading histopatologi merupakan faktor penentu prognosis dan merupakan komponen minimal yang harus dituliskan dalam dataset laporan histologi karsinoma payudara. (Papadimitriou, 2015)

Proses karsinogenesis karsinoma payudara sebagaimana karsinoma pada umumnya terjadi karena adanya perubahan fundamental dalam fisiologi sel yang dikenal sebagai *hallmarks of cancer*. Salah satu dari perubahan ini adalah kemampuannya untuk lolos dari respon imun pejamu. (Hanahan & Weinberg, 2011)

Peranan yang mendasar dari sistem kekebalan tubuh adalah memelihara homeostasis jaringan dengan melakukan *immunosurveillance* secara berkelanjutan dan menginisiasi reaksi inflamasi yang melibatkan koordinasi dari sistem kekebalan alami dan adaptif. Transformasi neoplastik mengubah struktur jaringan yang dapat menginduksi respon imun untuk mengeliminasi tumor. Tumor-tumor yang maligna umumnya disertai dengan infiltrasi dari sel-sel imun ke daerah dimana terjadi proliferasi dari sel tumor. Sel-sel imun yang menginfiltrasi tumor sering diamati, namun komposisi dari sel-sel yang terlibat sangat bervariasi tergantung dari tipe tumor dan organnya. Beberapa publikasi melaporkan efek dari infiltrasi limfosit pada tumor solid. Studi oleh Galon et al menunjukkan adanya

asosiasi yang signifikan antara sel-sel imun tertentu dengan respon klinis pada pasien-pasien dengan tumor solid. Lebih lanjut ditemukan bahwa imunitas adaptif yang dimediasi oleh limfosit T dan B memberikan respon antitumor yang kuat. Secara klinis infiltrasi sel-sel imun pada tumor telah menjadi suatu topik yang menarik dari studi karsinoma payudara karena peningkatan infiltrat sel-sel imun dapat menjadi faktor prediksi baik pada respon terhadap kemoterapi dan peningkatan survival (Gobert, 2009).

Respon imun terhadap tumor sangat kompleks, sel imun dapat menghambat pertumbuhan tumor (*immunoediting*), tetapi dapat juga meningkatkan pertumbuhan sel tumor dan angiogenesis. Immunoediting, terdiri dari 3 fase, yaitu fase eliminasi, fase equilibrium, dan fase escape (Dusyanthen, 2015). Meskipun sel-sel kanker ini akhirnya mampu lolos dari sistem imun dan berkembang menjadi sarang tumor malignant, banyak eksperimen yang menunjukkan bahwa adanya sebukan radang mononuklear berupa sel limfosit yang disebut *tumor-infiltrating lymphocytes* (TILs) pada pemeriksaan histopatologi spesimen kanker payudara memiliki prognosis yang lebih baik, termasuk dalam segi *disease free survival (DFS)*, dan juga terhadap respon terapi (Denkert et al., 2018; Salgado, 2015; West et al., 2011; Yamaguchi et al., 2012). TILs dianggap sebagai gambaran respon imun primer *host* melawan tumor, dimana TILs merupakan salah satu bagian penting dari lingkungan mikro tumor yang berperan dalam menekan pertumbuhan tumor. (Gooden, et al., 2011). Kehadiran TILs pada tumor diketahui dapat memberikan prognosis yang lebih baik. (Zgura, 2018;

Loi, 2019) Infiltrasi limfosit disini termasuk sel T, Tregulator (Treg), dan Natural Killer (NK) sel. (Dusyanthen, 2015).

Tregulator (Treg) berperan dalam pencegahan penyakit autoimun, tetapi juga dapat menghambat imunitas anti tumor dan mempromosikan pertumbuhan tumor. Treg juga berperan dalam menghambat sel limfosit T sitotoksik dengan menghambat pelepasan granula dari CD8+, dimana CD8+ mempunyai peran penting dalam membunuh sel tumor. FOXP3 merupakan biomarker spesifik Treg, juga berperan penting dalam perkembangan dan fungsi dari Treg. (Liu, 2014; Kim, 2014)

Penelitian tentang kehadiran FOXP3+ Treg pada tumor menunjukkan hasil yang masih kontroversi. Penelitian pada beberapa tumor melaporkan adanya FOXP3+ menunjukkan prognosis yang buruk, sebaliknya penelitian pada tumor lain menemukan bahwa FOXP3+ berkorelasi dengan prognosis yang baik. Pada karsinoma payudara, FOXP3+ TIL juga menunjukkan hasil yang berbeda, penelitian oleh Liu et al., Droser et al., Kim et al., menyatakan FOXP3+ TIL memberikan prognosis buruk, sebaliknya penelitian oleh West et al., menyatakan FOXP3+ TIL memberikan prognosis baik. (Liu, 2014)

Sejauh pengetahuan penulis, penelitian terhadap limfosit T regulator dan TILs pada karsinoma payudara invasif belum pernah dilakukan di Makassar. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti lebih lanjut terkait hubungan ekspresi FOXP3 Limfosit T regulator dengan derajat *Tumour-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) pada karsinoma payudara invasif.

## **I.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbedaan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif *grade 1* (diferensiasi baik), *grade 2* (diferensiasi sedang), dan *grade 3* (diferensiasi buruk)?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi FOXP3 limfosit Treg pada karsinoma payudara invasif *grade 1* (diferensiasi baik), *grade 2* (diferensiasi sedang), dan *grade 3* (diferensiasi buruk)?
3. Apakah terdapat perbedaan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif dengan ekspresi FOXP3 limfosit Treg yang negatif dan positif?

## **I.3. Tujuan Penelitian**

### **I.3.1. Tujuan Umum**

Menentukan hubungan ekspresi FOXP3 limfosit Treg dengan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif.

### **I.3.2. Tujuan Khusus**

1. Menentukan diagnosis karsinoma payudara invasif *grade 1* (diferensiasi baik), *grade 2* (diferensiasi sedang), dan *grade 3* (diferensiasi buruk) berdasarkan pewarnaan H.E.
2. Menentukan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif *grade 1* (diferensiasi baik), *grade 2* (diferensiasi sedang), dan *grade 3* (diferensiasi buruk) dengan pewarnaan H.E.

3. Menentukan ekspresi FOXP3 limfosit Treg pada karsinoma payudara invasif *grade* 1 (diferensiasi baik), *grade* 2 (diferensiasi sedang), dan *grade* 3 (diferensiasi buruk) dengan pewarnaan immunohistokimia.
4. Membandingkan derajat TILs antara karsinoma payudara invasif dengan ekspresi FOXP3 limfosit Treg positif dan karsinoma payudara invasif dengan ekspresi FOXP3 limfosit Treg negatif.

#### **I.4. Hipotesis**

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. Terdapat perbedaan derajat TILs karsinoma payudara invasif antara *Grade* 1 (diferensiasi baik), *Grade* 2 (diferensiasi sedang), dan *Grade* 3 (diferensiasi buruk), yaitu: semakin rendah derajat TILs, semakin buruk derajat diferensiasinya.
2. Terdapat perbedaan ekspresi FOXP3 limfosit Treg karsinoma payudara invasif antara *Grade* 1 (diferensiasi baik), *Grade* 2 (diferensiasi sedang), dan *Grade* 3 (diferensiasi buruk), yaitu: semakin positif ekspresi FOXP3 limfosit Treg, semakin buruk derajat diferensiasinya.
3. Terdapat hubungan ekspresi FOXP3 limfosit Treg dengan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif : semakin positif ekspresi FOXP3 limfosit Treg, maka semakin rendah derajat TILs.

## **I.5. Manfaat Penelitian**

### **1.5.1. Manfaat Bagi Bidang Akademik**

Memberikan informasi ilmiah tentang konsep biologis hubungan ekspresi FOXP3 limfosit Treg dan derajat TILs pada karsinoma payudara invasif berdasarkan derajat histopatologi.

### **1.5.2 Manfaat Bagi Bidang Pelayanan**

Data penelitian ini dapat digunakan sebagai faktor prediktif dan faktor prognostik karsinoma payudara invasif terutama untuk kepentingan imunoterapi.

### **1.5.3 Manfaat Bagi Bidang Penelitian**

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam bidang imunologi dan imunoterapi karsinoma payudara invasif duktal.

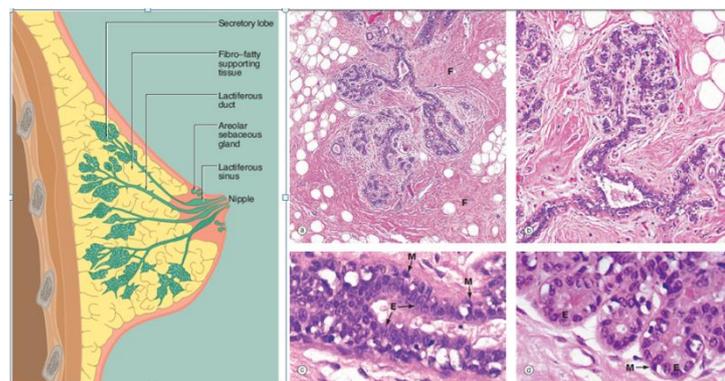
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### II.1. Anatomi dan Histologi Payudara

Organ payudara (kelenjar mammary) merupakan kelenjar keringat apokrin yang termodifikasi yang berkembang secara embriologi dari *mammary ridges* atau *milk lines*, berupa penebalan dari epidermis yang pertama kali terlihat pada permukaan ventral fetus usia 5 minggu (Hoda, Brogi, Koerner, & Rosen, 2015).

Setiap payudara terdiri dari 15-25 unit glandular yang disebut lobus, terdiri dari kelenjar tubulo-asiner, tersusun di antara jaringan lemak dan jaringan ikat fibrous serta kolagen. Pada setiap lobus tersebut, duktus utama akan bercabang membentuk duktus terminal yang mengarah ke sebuah lobulus yang terdiri dari beberapa asinus kelenjar mamma. Unit ini di sebut *terminal duct-lobular unit* (TDLU). Lobus-lobus ini dipisahkan oleh jaringan ikat kolagen interlobular dengan tingkat kepadatan yang sedang, sedangkan jaringan ikat kolagen intralobular lebih longgar dan lebih banyak vaskularisasinya. Setiap lobus akan mengarah ke satu duktus besar yang disebut duktus laktiferus, sebelum mencapai permukaan akan mengalami dilatasi yang disebut sinus laktiferus, dan akhirnya mengarah ke permukaan puting. Duktus-duktus dan asini payudara dilapisi oleh dua lapis sel, yaitu lapisan luminal yang terdiri dari sel-sel epitel dan lapisan basal yang terdiri dari sel-sel myoepitel. Pada duktus yang lebih besar, lapisan luminalnya berupa epitel kolumnar tinggi, sedangkan pada duktus yang lebih kecil dan

pada asini lapisan luminalnya berupa epitel kuboid. Lapisan basal terdiri dari sel-sel myoepitel stellat dengan sitoplasma yang pucat, tersusun secara diskontinyu mengelilingi duktus atau asini (Kumar, Vinay; Abbas, 2015; Young et al., 2006).



Gambar 1. Struktur payudara secara skematik dan mikroskopik. a. *Terminal-duct lobular unit (TDLU)* pada pembesaran lemah, diantaranya tampak jaringan ikat fibrous (F) dan jaringan lemak; b. Pembesaran lebih kuat, nampak jaringan ikat kolagen interlobuler dan sistem duktus yang bercabang; c dan d. Pembesaran kuat, nampak epitel yang melapisi duktus dan asinus kelenjar mammae dilapisi 2 sel, sel epitel kuboid (E) dan sel mioepitel (M) (Young et al., 2006)

## II.2. Karsinoma Payudara

### II.2.1. Definisi Karsinoma Payudara

Karsinoma payudara, suatu lesi ganas dari epitel, merupakan jenis keganasan (diluar kasus keganasan pada kulit) paling sering pada wanita, dan merupakan penyebab kematian tersering kedua setelah kanker paru (Kumar, Vinay; Abbas, 2015).

Sebagaimana dipaparkan dalam uraian di atas, payudara terdiri dari dua struktur utama (duktus dan lobus), dua jenis epitel (luminal dan myoepitel), dan dua jenis stroma (interlobuler dan intralobuler). Lesi pada payudara bisa berasal dari kesemua komponen tersebut, baik jinak maupun ganas (Kumar, Vinay; Abbas, 2015).

## II.2.2. Faktor Risiko Karsinoma Payudara

Karsinoma payudara 99% terjadi pada perempuan. Faktor risiko utama berhubungan dengan faktor herediter dan paparan terhadap estrogen selama masa kehidupan, dan yang lebih sedikit pengaruhnya adalah yang berhubungan dengan faktor lingkungan dan gaya hidup. Berikut ini adalah faktor risiko-faktor risiko yang telah diidentifikasi (Kumar, Vinay; Abbas, 2015; Lakhani, 2012) :

### 1. Mutasi *germline*

Mutasi *germline* pada *tumor suppressor genes* terjadi pada 5-10% kasus karsinoma payudara. Pada individu dengan mutasi ini, kemungkinan terkena karsinoma payudara bisa >90%.

### 2. Hubungan keluarga *first-degree* yang menderita karsinoma payudara.

Penelitian menunjukkan 15-20% penderita karsinoma payudara memiliki keluarga *first-degree* (ibu, anak, saudara) yang menderita penyakit yang sama, tanpa adanya mutasi gen. Kemungkinan ini terjadi karena memiliki gen-gen yang kerentanannya rendah kemudian dipicu oleh faktor lingkungan. Perlu diingat bahwa hal ini tidak berlaku jika keluarga yang menderita adalah perempuan yang telah post menopause.

### 3. Ras/etnis

Latar belakang etnis berhubungan dengan resiko karsinoma payudara. Di Amerika Serikat insidens karsinoma payudara paling tinggi pada wanita kulit putih *non-hispanic*.

4. Usia

Risiko karsinoma payudara makin meningkat seiring bertambahnya usia pada wanita, puncaknya pada usia 70-80 tahun dan sedikit menurun setelahnya.

5. Usia saat *menarche*

Usia *menarche* <11 tahun risiko menderita karsinoma payudara meningkat hingga 20% dibandingkan wanita dengan usia *menarche* >14 tahun. Risiko juga meningkat pada wanita yang usia menopausenya lebih lambat.

6. Usia ketika melahirkan pertama kali

Wanita yang melahirkan (cukup bulan) pertama kali pada usia <20 tahun akan mengurangi risiko hingga setengahnya dibandingkan dengan wanita nullipara ataupun wanita yang melahirkan pertama kali pada usia >35 tahun.

7. Penyakit payudara jinak

Adanya riwayat biopsi dengan hasil hiperplasia atipikal dan lesi proliferasi jinak meningkatkan risiko karsinoma invasif.

8. Paparan terhadap estrogen

Pemberian terapi hormonal menopause meningkatkan risiko karsinoma payudara terutama jika estrogen dan progestin diberikan

secara bersamaan selama beberapa tahun. Pengurangan estrogen endogen dengan melakukan ooferektomi akan menurunkan risiko hingga 75% pada karsinoma payudara yang telah terjadi.

#### 9. Densitas payudara

Wanita dengan densitas payudara yang sangat padat pada pemeriksaan mammografi memiliki risiko lebih tinggi hingga 4-6 kali terhadap karsinoma payudara dibandingkan wanita dengan densitas payudara yang lebih rendah. Densitas yang tetap padat pada wanita yang lebih tua bisa terjadi akibat kegagalan involusi.

#### 10. Paparan radiasi

Radiasi pada area dada karena terapi kanker, akibat paparan bom atom, ataupun kecelakaan nuklir. Risikonya paling besar pada wanita yang terpapar pada usia muda dan dengan dosis yang tinggi. Risiko serupa tidak terjadi pada wanita usia yang lebih tua.

#### 11. Karsinoma payudara kontralateral atau karsinoma endometrium

Sekitar 1% dari penderita karsinoma payudara menderita karsinoma payudara kedua pada kontralateral setiap tahun. Risiko yang sama pada penderita karsinoma endometrium karena paparan estrogen yang lama merupakan faktor risiko yang sama.

#### 12. Diet

Berbagai bahan dalam diet, terutama makanan berlemak, dilaporkan meningkatkan risiko. Beberapa studi, memperlihatkan adanya

penurunan resiko pada peningkatan asupan  $\beta$ -karoten. Konsumsi alkohol sedang dan berat juga meningkatkan risiko.

#### 13. Obesitas

Wanita obese usia <40 tahun memiliki risiko yang lebih rendah karena siklus anovulasi dan rendahnya level progesteron. Sebaliknya, wanita obese post menopause akan meningkat risikonya karena produksi estrogen dari simpanan lemaknya.

#### 14. Aktivitas fisik

Mungkin terdapat sedikit efek protektif pada perempuan yang aktif secara fisik.

#### 15. Menyusui

Semakin lama wanita menyusui maka semakin besar perlindungan terhadap risiko karsinoma payudara. Proses laktasi akan menekan ovulasi dan bisa memacu diferensiasi sel luminal.

#### 16. Toksin lingkungan

Kontaminan lingkungan seperti pestisida organoklorin memiliki efek estrogenik. Adanya kemungkinan hubungan dengan peningkatan risiko karsinoma payudara sedang diteliti secara intensif, namun belum jelas.

### **II.2.3. Karsinogenesis Karsinoma Payudara**

Karsinoma payudara, sebagaimana jenis kanker lainnya, merupakan proliferasi klonal dari sel-sel epitel akibat perubahan genetik multipel karena

adanya paparan hormon dan adanya gen-gen rentan yang diturunkan (Kumar, Vinay; Abbas, 2015).

Perubahan genetik yang dihubungkan dengan transisi dari epitelium normal menjadi hiperplasia dan akhirnya karsinoma yang melibatkan kejadian berseri yaitu tahap inisiasi, transformasi, dan progresi. Hanya sedikit dari lesi proliferasif yang benar-benar berkembang dan melewati kesemua tahap ini sebelum menjadi karsinoma invasif, dan sepertinya kebanyakan tidak pernah melewati tahap awal inisiasi yaitu hiperplasia (Hoda et al., 2015).

Saat ini telah dihipotesiskan bahwa sebagaimana jenis kanker lainnya, sel yang menjadi sumber dari karsinoma payudara ini adalah stem sel jaringan payudara sendiri. Saat terjadi proses inisiasi dari sel tersebut karena mutasi *driver* (onkogen), terdapat 3 jalur karsinogenesis yang utama: (Kumar, Vinay; Abbas, 2015; Simpson, Reis-Filho, Gale, & Lakhani, 2005)

1. Karsinoma payudara *ER* positif dan *Her2* negatif.

Merupakan subtipe yang paling sering muncul pada individu dengan mutasi *germline BRCA2*, terdapat pada 50-60% kasus karsinoma payudara. Sering dikaitkan dengan adanya penambahan kromosom 1q, hilangnya kromosom 16q dan mutasi teraktivasi gen *PIK3CA*. Gen *PIK3CA* merupakan gen yang mengkode *phosphoinositide-3 kinase (PI3K)* yang merupakan komponen penting dalam jalur sinyal *downstream* dari reseptor faktor-faktor pertumbuhan. Subtipe ini

biasanya *low-grade* dan dihipotesiskan bahwa lesi prekursornya berupa *flat epithelial atypia* dan *atypical ductal hyperplasia* karena terdapat persamaan pada lesi genetiknya. Subtipe ini juga disebut tipe "luminal" karena lesi ini menyerupai sel-sel luminal jaringan payudara normal dilihat dari pola ekspresi mRNA nya yang didominasi oleh gen-gen yang diregulasi oleh estrogen.

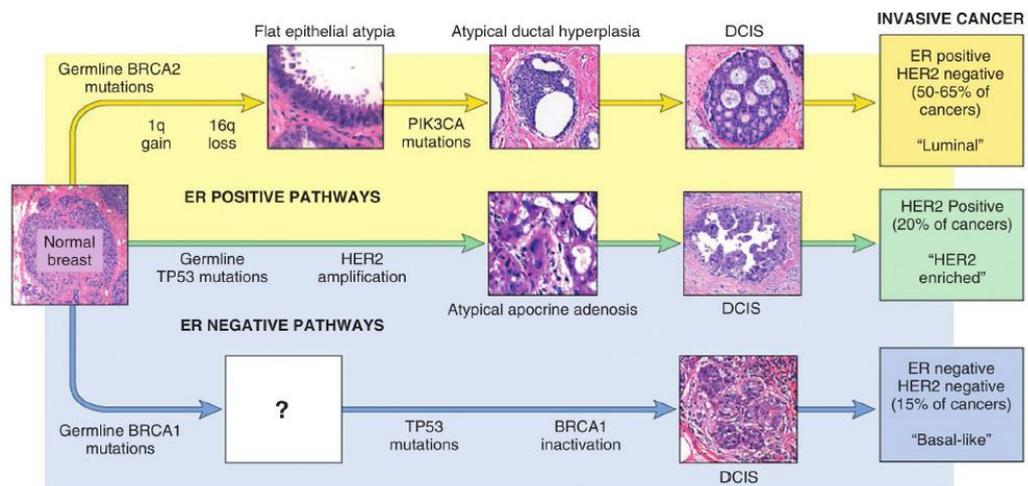
2. Karsinoma payudara *Her2* positif, bisa *ER* positif maupun *ER* negatif.

Subtipe ini berkembang melalui jalur yang kuat hubungannya dengan amplifikasi dari gen *Her2* pada kromosom 17q, terjadi pada sekitar 20 % kasus karsinoma payudara. Merupakan subtipe yang paling sering pada individu dengan mutasi pada gen *TP53* (Sindrom Li-Fraumeni), dengan pola ekspresi gen yang didominasi oleh gen-gen proliferasi yang diregulasi oleh jalur sinyal reseptor *Her2* tyrosin kinase. Subtipe ini biasanya *high-grade* dengan lesi prekursor berupa *atypical apocrine adenosis*.

3. Karsinoma payudara *ER* negatif dan *Her2* negatif.

Subtipe ini berkembang melalui jalur berbeda, tidak berhubungan dengan perubahan ekspresi genetik yang dimediasi *ER* ataupun amplifikasi dari gen *Her2*. Merupakan subtipe yang jalurnya paling kurang dimengerti, terdapat pada sekitar 15 % kasus, paling sering pada individu dengan mutasi *germline BRCA1*. Subtipe ini disebut juga "*basal-like*" karena pola ekspresi mRNA nya sama dengan yang diekspresikan oleh sel-sel myoepitel/sel basal. Terdapat tumor

sporadik dari subtype ini yang sering memiliki mutasi *loss of function* dari gen *TP53* tanpa mutasi *BRCA1* (*BRCA1* bisa mengalami *silencing* melalui proses epigenetik).



Gambar 2. Jalur utama perkembangan kanker payudara, terdiri dari 3 jalur. Jalur yang paling sering adalah dengan panah kuning yang menyebabkan karsinoma *ER*<sup>+</sup>. Lesi prekursornya berupa *flat epithelial atypia* dan *atypical hyperplasia*. Jalur yang lebih jarang yang ditunjukkan oleh panah biru yang menyebabkan karsinoma dengan *ER*<sup>-</sup> dan *HER2*<sup>-</sup>. Pada jalur ini lesi prekursor tidak diketahui dengan jelas. Jalur ketiga yang ditunjukkan oleh panah hijau yang merupakan kanker payudara dengan *HER2*<sup>+</sup>, yang *ER* nya bisa positif maupun negatif. Amplifikasi gen *HER2* juga ada pada lesi apokrin atipikal sehingga dianggap lesi prekursor. Setiap subtype molekuler memiliki profil ekspresi gen yaitu luminal, *HER2 enriched*, dan *basal-like*. (Kumar, Vinay; Abbas, 2015)

Selama proses perkembangannya, sel-sel epitel neoplastik ini tidak bekerja sendiri tetapi membutuhkan interaksi dengan sel-sel stroma dan matriks ekstraseluler yang merupakan komponen utama dari *tumor microenvironment (TME)*, bersama dengan pembuluh darah dan limfe serta sel-sel inflamasi. Perubahan fokal pada *TME* bisa memiliki peran langsung dengan menciptakan lingkungan yang kondusif untuk perkembangan dan pertumbuhan tumor (Kumar, Vinay; Abbas, 2015; Pitt et al., 2016).

#### **II.2.4. Karsinoma Payudara Invasif Tanpa Tipe Tertentu**

Suatu karsinoma disebut invasif jika terdapat invasi ke stroma tanpa mempertimbangkan adanya komponen *in situ* atau tidak (Rosai, 2011). Karsinoma payudara invasif duktal merupakan kelompok tumor ganas pada payudara dengan insidens terbesar, yaitu sekitar 40% - 75% (Hoda et al., 2015; Lakhani, 2012). Karsinoma payudara invasif duktal sekarang menggunakan terminologi baru yang disepakati dalam buku Klasifikasi WHO Pada Tumor Payudara tahun 2014, disebut sebagai "*invasive carcinoma mammae, no special type*". Penggunaan kata '*ductal*' dianggap kurang tepat karena ini menunjukkan bahwa lesi ini spesifik berasal dari epitel duktus kelenjar payudara, dibedakan dengan karsinoma lobular yang menurut pemberian namanya berasal dari lobulus, dimana pada keduanya belum ada bukti yang jelas. Selain itu, penelitian menunjukkan bahwa *TDLU* merupakan satu-satunya asal berkembangnya karsinoma payudara (Lakhani, 2012). Namun demikian beberapa kelompok dan buku masih menggunakan terminologi yang menggunakan kata '*ductal*' dengan menambahkan kata '*not otherwise specified*' (Hoda et al., 2015; Lakhani, 2012). Di penelitian ini sendiri digunakan terminologi "karsinoma payudara invasif duktal", namun pada pengambilan sampel memasukkan semua karsinoma payudara yang didiagnosa baik sebagai "karsinoma payudara invasif duktal" maupun "*invasive carcinoma mammae, no special type*" mengingat apa yang dimaksudkan oleh kedua terminologi ini adalah sama.

Secara makroskopik jenis tumor ini gambaran makroskopik yang khas. Ukuran (<10 mm hingga >100 mm), bentuk, konsistensi, dan marjin sangat bervariasi. Pada penampang irisan untuk kasus yang khas biasanya keras, tidak berbatas tegas, berwarna kuning keabuan, dan terasa seperti berpasir ketika dipotong dengan pisau (Lakhani, 2012; Rosai, 2011). Bisa terdapat area nekrosis, perdarahan, dan degenerasi kistik terutama pada lesi yang besar. (Rosai, 2011)

Pada pemeriksaan mikroskopik, pada dasarnya karsinoma payudara yang dimasukkan dalam kelompok ini melalui metode eksklusi, yaitu jika tidak termasuk dalam kelompok subtype lain. Oleh karena itu gambaran morfologinya sangat bervariasi. Secara arsitektur sel-sel tumor ini bisa tersusun dalam bentukan pita, kelompokan sel, ataupun trabekula, serta dapat pula tersusun solid atau tumbuh infiltratif dan sinsitial dengan hanya sedikit stroma diantaranya. Pada beberapa kasus diferensiasi ke arah glanduler dapat pula terlihat sebagai bentukan tubuler dengan lumen sentral dalam kelompokan sel-sel tumor. Sel-sel tumor individunya pun bervariasi. Sitoplasmanya bisa sangat banyak dan eosinofilik, nukleusnya bisa seragam dalam bentuk dan ukuran tetapi dapat pula sangat pleomorfik dengan nukleoli yang sangat prominent dan seringkali multipel, jumlah mitosis bisa tidak ada ataupun malah sangat banyak. Pada umumnya (sekitar 80% kasus), komponen *ductal carcinoma in situ (DCIS)* akan nampak dengan morfologi inti yang sama dengan komponen infiltratifnya. Komponen stromanya juga sangat bervariasi, bisa sangat seluler berupa

proliferasi dari sel-sel fibroblastik, dapat pula berupa jaringan ikat yang sangat sedikit, ataupun berupa hialinisasi. Selain itu dapat pula terlihat gambaran nekrosis fokal ataupun nekrosis yang luas disertai pembentukan kista yang sifatnya sekunder. Pada beberapa kasus bisa terlihat adanya infiltrat plasmositoid yang jelas (Lakhani, 2012).

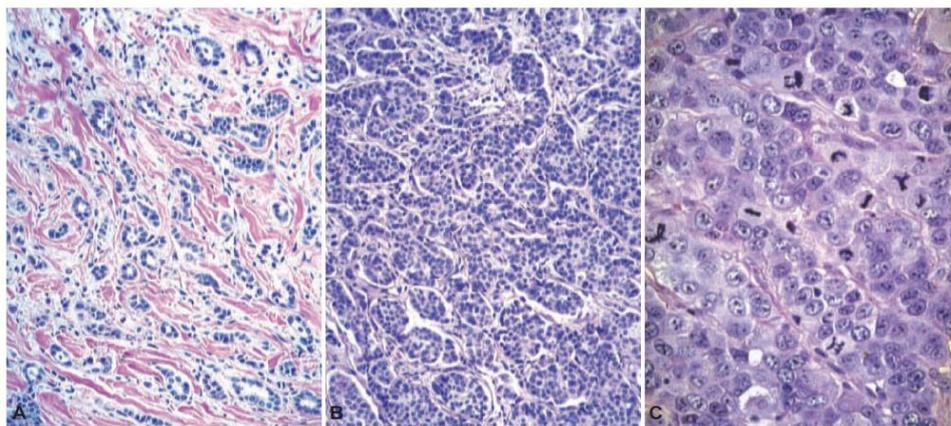
Menurut WHO, suatu tumor bisa diklasifikasikan dalam kelompok karsinoma payudara invasif tanpa tipe tertentu jika pola non spesifiknya terdapat pada > 50% sediaan yang diperiksa. Jika hanya 10%-40% saja dan komponen sisanya masuk dalam klasifikasi subtype tertentu yang jelas, maka karsinoma ini dimasukkan dalam kelompok *mixed invasive NST and special type* ataupun *mixed invasive NST and lobular carcinoma* (Lakhani, 2012).

#### **II.2.5. Sistem Grading Karsinoma Payudara Invasif**

Karsinoma payudara invasif tanpa tipe tertentu dan karsinoma payudara invasif tipe lainnya harus digrading berdasarkan penilaian terhadap bentuk glanduler/tubulus, pleomorfisme inti, dan jumlah mitosis. Saat ini sistem grading yang digunakan adalah metode semikuantitatif hasil modifikasi Elston & Ellis yang secara garis besar dijabarkan pada tabel dibawah ini (Damjanov, 2013; Hoda et al., 2015; Lakhani, 2012).

Histologic Feature			Score
<b>Glandular/Tubular Differentiation</b>			
>75% of tumor area with gland formation			1
10%–75% of tumor area with gland formation			2
<10% of tumor area with gland formation			3
<b>Nuclear Pleomorphism</b>			
Nuclei small, regular contour, little variation in size, uniform chromatin			1
Nuclei moderate variation in size and shape, open vesicular chromatin, visible nucleoli			2
Nuclei marked variation in size and shape, open vesicular chromatin, prominent nucleoli			3
<b>Mitotic Count*</b>			
≤3 mitoses/mm <sup>2</sup> field area	≤5 mitoses/ 10 fields <sup>†</sup>	≤8 mitoses/ 10 fields <sup>‡</sup>	1
4–7 mitoses/mm <sup>2</sup> field area	6–10 mitoses/ 10 fields <sup>†</sup>	9–17 mitoses/ 10 fields <sup>‡</sup>	2
≥8 mitoses/mm <sup>2</sup> field area	≥11 mitoses/ 10 fields <sup>†</sup>	≥18 mitoses/ 10 fields <sup>‡</sup>	3
<b>SBR Grade</b>			
Grade 1 (well differentiated): total scores of 3, 4, or 5			
Grade 2 (moderately differentiated): total scores of 6 or 7			
Grade 3 (poorly differentiated): total scores of 8 or 9			

Tabel 1. Grading karsinoma payudara dengan metode semikuantitatif hasil modifikasi Elston & Ellis



Gambar 3. Gambaran histopatologi : A. Karsinoma payudara invasif duktal grade I; B. Karsinoma payudara invasif duktal grade II; C. Karsinoma payudara invasif duktal grade III, tidak ada bentukan glanduler, banyak mitosis dengan beberapa menunjukkan mitosis abnormal (Lakhani, 2012)

## II.2.6. Subtipe Karsinoma Payudara

Terdapat empat subtipe karsinoma payudara yang diidentifikasi berdasarkan ER dan PR berlebihan atau tidak ada sama sekali dan adanya amplifikasi berlebihan pada onkogen HER-2. Empat subtipe sudah dikenal adalah luminal A, luminal B, HER-2 *overexpression* dan *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC) (Zaha, 2014; Salgado, 2015).

### 1. Luminal A

Karsinoma payudara dengan subtipe luminal yang paling sering ditemukan, sekitar 50-60% dari seluruh subtipe karsinoma payudara. Karsinoma payudara luminal A terdiri dari ER positif, dan/atau PR positif, HER-2 negatif, dan memiliki kadar protein Ki-67 yang rendah. Karsinoma luminal A yang diterapi dengan hormonal memiliki prognosis baik, tingkat survival yang tinggi dan angka rekurensi yang rendah. (Fragomeni, 2018; Ebili, 2014)

### 2. Luminal B

Karsinoma payudara subtipe luminal B ditemukan sekitar 15-20% dari seluruh subtipe karsinoma payudara dan memiliki fenotipe lebih agresif, dengan tingkat keganasan dan kekambuhan lebih tinggi, indeks proliferasi dan prognosis lebih buruk dibandingkan dengan luminal A. Karsinoma payudara luminal B terdiri dari ER+ dan PR+, sel-sel aktif dengan mitosis yang tinggi sehingga Ki-67 positif, sering dengan HER-2 negatif atau positif (Fragomeni, 2018; Ebili, 2014).

### 3. HER-2 *overexpression*

Subtipe HER-2 *overexpression* ditemukan sekitar 15-20% dari subtipe karsinoma payudara. Karsinoma payudara subtipe HER-2 *overexpression* terdiri dari ER negatif, PR negatif dengan peningkatan ekspresi gen HER-2 dan gen lain terkait dengan jalur HER-2. HER-2 *overexpression* baik secara biologis ataupun klinis bersifat lebih agresif, memiliki tingkat metastasis ke otak dan paru-paru lebih tinggi dan prognosis lebih buruk dibandingkan dengan subtipe luminal, tetapi sering berhasil diobati dengan target terapi yang menghambat kerja protein HER-2 seperti Herceptin (Trastuzumab) (Fragomeni, 2018; Ebili, 2014).

### 4. Triple negative/basal-like

Karsinoma payudara dengan ER negatif, PR negatif dan HER2 negatif (*triple negative breast cancer/ TNBC*), sering pula disebut dengan *basal-like* karena sel tumor memiliki gambaran yang sama dengan sel basal di sekitar duktus mammary. Jenis karsinoma ini lebih umum pada wanita dengan mutasi BRCA1. Sekitar 15-20% karsinoma payudara dengan subtipe TNBC dan sering pada wanita usia muda (Fragomeni, 2018; Ebili, 2014).

## II. 3. Faktor Prognostik dan Prediktif Kanker Payudara

Sepanjang dekade terakhir, integrasi dari penanda prognostik dan prediktif dalam pengambilan keputusan penanganan pasien menjadikan terapi menjadi lebih teindividualisasi dan optimal. Faktor prognosis

merupakan resiko dari suatu penyakit untuk menjadi rekuren atau menyebabkan kematian tanpa adanya intervensi obat, sedangkan faktor prediktif merupakan probabilitas dari respon terhadap suatu pengobatan tertentu. Suatu keputusan klinik harus dibuat untuk menghindari terapi berlebihan (*overtreatment*), terapi yang tidak cukup (*undertreatment*), dan terapi yang tidak sesuai (*incorrect treatment*). Pemahaman yang lebih mendalam terhadap biologi kanker payudara, penggunaan biomarker klasik, dan identifikasi dari penanda/marker baru diperlukan untuk menentukan pasien yang perlu mendapatkan terapi dan terapi mana yang tepat atau paling efisien (Stickeler, 2011).

Ada beberapa faktor prognostik berkaitan dengan penampilan klinis, patologis dan molekuler tumor yang dapat digunakan sebagai faktor prediktif dalam pengobatan :

1. Faktor Prognostik Klinis (Ukuran, Kelenjar Getah Bening, Metastase).

Penanda prognostik klinis berkaitan dengan ukuran, status kelenjar getah bening dan metastasis yang diklasifikasikan menggunakan sistem TNM. Sistem staging TNM mengintegrasikan ukuran tumor (T), keterlibatan kelenjar getah bening (N) dan metastasis (M) dimana prognosis *5 years survival* masing-masing stadium yaitu; stadium 1 (92%), stadium IIa (82%), stadium IIb (65%), stadium IIIa (47%), stadium IIIb (44%), stadium IV (14%) (Taneja et al., 2010).

Stadium	T (Ukuran tumor/mm)	N (Lymph node)	M (Metastasis)
0	Tis (in situ DCIS, LCIS, Paget disease)	N0	M0
IA	T1a ( $\leq 1$ mm)	N0	M0
IB	T0 (no tumor)	N1mi	M0
	T1a ( $> 1$ mm but $\leq 5$ mm)	N1mi	M0
IIA	T0	N1mi	M0
	T1a	N1b	M0
	T2 ( $> 20$ mm but $\leq 50$ mm)	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3 ( $> 50$ mm)	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1a	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4 (Extension to chest wall/skin)	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Any T	N3	M0
IV	Any T	Any N	M1

Tabel 2: Stadium kanker payudara berdasarkan *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* edisi 7 tahun 2010

## 2. Faktor Prognostik Patologi (Grading Histopatologi)

Hubungan antara grading histopatologi dengan prognosis berdasarkan WHO adalah untuk *low grade* persentase untuk *survival rate* 5 dan 10 tahun adalah 75% dan 45%. Pada *moderate grade* angka ini sebesar 53% dan 27%, sedangkan *high grade* didapatkan angka 31% dan 18% (Elston CW1, 2013).

## 3. Faktor Prognostik Molekuler

Penanda molekuler ini didasarkan pada keberadaan protein dalam tumor yang berkontribusi terhadap prognosis dan memungkinkan untuk target terapi.

Defining Features	ER-positive, HER2-negative	HER2-Positive (ER-Positive or Negative*)	ER-Negative <sup>†</sup> HER2-Negative
Frequency	~40-55% (Low proliferation)	~10% (High proliferation)	~20%
Included special histologic types	Well or moderately differentiated lobular, tubular, mucinous	Poorly differentiated lobular	Some apocrine
Typical patient groups	Older women, men, cancers detected by mammographic screening	<i>BRCA2</i> mutation carriers	Young women, non-white women, <i>TP53</i> mutation carriers (ER positive)
Metastatic pattern	Bone (70%), more common than visceral (25%) or brain (<10%)	Bone (80%) more common than visceral (30%) or brain (10%)	Bone (70%), visceral (45%), and brain (30%) are all common
Relapse pattern	Late, >10 years, long survival possible with metastases	Intermediate	Usually short, <10 years, survival with metastases rare
Complete response to chemotherapy	<10%	~10%	ER positive—15% ER negative—>30%

\*About half of HER2-positive cancers are ER positive and half ER negative. ER and PR levels tend to be low in this group.

<sup>†</sup>This group is also referred to as "triple negative" carcinoma.

<sup>‡</sup>Some special histologic types have a more favorable prognosis than this group as a whole.

Tabel 3. Subtipe molekuler kanker payudara disertai komponen prognostik dan prediktifnya (Kumar, Vinay; Abbas, 2015)

## II.4. Aspek Immunologi Tumor

### II.4.1. Antigen Tumor

Berbagai tumor ganas mengekspresikan berbagai jenis molekul yang akan dikenali oleh sistem imun sebagai antigen asing. Jika sistem imun mampu bereaksi terhadap tumor pada seorang individu, tumor tersebut pasti mengekspresikan antigen yang dilihat sebagai antigen asing (*nonself*) oleh sistem imun individu tersebut. (Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H. and Pillai, 2016)

Klasifikasi dari antigen tumor ini awalnya dibagi dua berdasarkan pola ekspresinya, yaitu *tumor-specific antigen* dan *tumor-associated antigen*. *Tumor-specific antigen* merujuk pada antigen yang diekspresikan hanya oleh sel tumor dan tidak pada sel normal, bisa bersifat unik hanya

diekspresikan oleh satu jenis tumor dan bisa pula oleh beberapa tumor dengan tipe yang sama. Sementara *tumor-associated antigen* merujuk pada antigen yang diekspresikan baik oleh sel tumor maupun oleh sel normal namun mengalami perubahan atau disregulasi (Abbas et al., 2017).

Sekarang ini klasifikasi modern berdasarkan pada struktur molekuler, sumber antigen yang diekspresikan oleh sel tumor yang menstimulasi sel T, dan respon antibodi terhadap pejamunya.

Berikut ini merupakan pembagian utama dari antigen : (Abbas et al., 2017)

A. Produk dari gen-gen yang bermutasi.

Onkogen dan gen-gen *tumor suppressors* yang bermutasi akan menghasilkan protein yang berbeda dengan protein seluler normal yang akhirnya bisa memicu respon tumor. Contoh produk onkogen adalah mutasi Ras, yang didapatkan pada sekitar 10% karsinoma pada manusia. Contoh produk gen *tumor suppressors* adalah p53 yang bermutasi yang didapatkan pada sekitar 50% tumor pada manusia. Produk-produk dari gen ini bisa berupa protein sitosol maupun nuklear yang mengalami degradasi dalam proteasom sehingga bisa dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I.

B. Protein seluler yang tidak bermutasi namun terekspresi secara abnormal.

Antigen tumor ini merupakan protein normal yang ekspresinya abnormal, sehingga memacu sistem imun. Contohnya adalah HER2

(*human epidermal growth factor receptor 2*)/Neu yang mengalami overekspresi pada kanker payudara dan karsinoma lainnya.

C. Antigen dari virus onkogenik.

Produk dari virus onkogen ini berperan sebagai antigen yang dapat memicu respon dari sel T. Kebanyakan dari tumor yang diinduksi oleh virus DNA ini, protein antigen yang mengkode virus terdapat dalam nukleus, sitoplasma, dan membran plasma sel tumor. Protein virus yang disintesis secara endogen ini dapat diproses dan dipresentasikan oleh molekul MHC pada permukaan sel tumor. Peptida virus ini merupakan antigen asing, karenanya tumor yang diinduksi virus DNA ini merupakan tumor paling imunogenik yang diketahui. Contohnya virus EBV (*Epstein-Barr virus*) penyebab limfoma sel B dan kanker nasofaring, HPV (*human papilloma virus*) penyebab karsinoma di serviks, orofaring dan tempat lain, dan lain-lain. Contoh virus RNA (retrovirus) adalah *human T-lymphotropic virus type 1* (HTLV-1) yang merupakan penyebab leukimia atau limfoma sel T pada orang dewasa.

D. Antigen Onkofetal

Protein ini terekspresi normal selama perkembangan normal fetus tetapi tidak pada jaringan matur, terekspresi pada level tinggi pada beberapa jenis kanker. Contohnya adalah *carcinoembryogenic antigen* (CEA) yang konsentrasinya meningkat pada keganasan kolon, pankreas, lambung, dan payudara. A-fetoprotein (AFP) juga merupakan antigen onkofetal yang meningkat pada karsinoma hepar,

kanker sel germinal, dan kadang-kadang pada kanker pankreas dan lambung. Protein ini juga digunakan sebagai penanda tumor sehingga cukup penting untuk kepentingan diagnosis.

E. Antigen berupa glikolipid dan glikoprotein yang mengalami perubahan. Kebanyakan dari tumor pada manusia dan tumor eksperimental mengekspresikan glikoprotein dan glikolipid permukaan yang konsentrasinya lebih tinggi ataupun dalam bentuk abnormal, yang dapat berfungsi sebagai penanda diagnostik maupun terapi target. Molekul ini dapat berupa gangliosid, antigen *blood group*, dan musin. Gangliosid yaitu GM2, GD2, dan GD3 merupakan glikolipid yang mengalami overekspresi pada neuroblastoma, melanoma, dan banyak sarkoma.

F. Antigen *tissue-specific differentiation*

Tumor-tumor dapat mengekspresikan molekul yang secara normal hanya terekspresi pada sel asal tumor dan tidak pada jaringan lainnya. Antigen ini disebut *differentiation antigens* karena spesifik untuk stadium diferensiasi tertentu dari berbagai macam jenis sel. Contohnya adalah *tyrosine* pada melanoma yang merupakan antigen diferensiasi melanosit. Contoh lain adalah CD10 dan CD20 yang merupakan penanda permukaan dari tumor-tumor yang berasal dari sel B. Antigen-antigen ini merupakan molekul normal diri sendiri sehingga biasanya tidak menginduksi respon imun yang kuat.

## II.4.2. Respon imun terhadap tumor

Sebagaimana telah dibahas sebelumnya, respon terhadap tumor umumnya dibagi menjadi 3 fase yaitu (Dunn *et al.*, 2004):

### A. Fase eliminasi

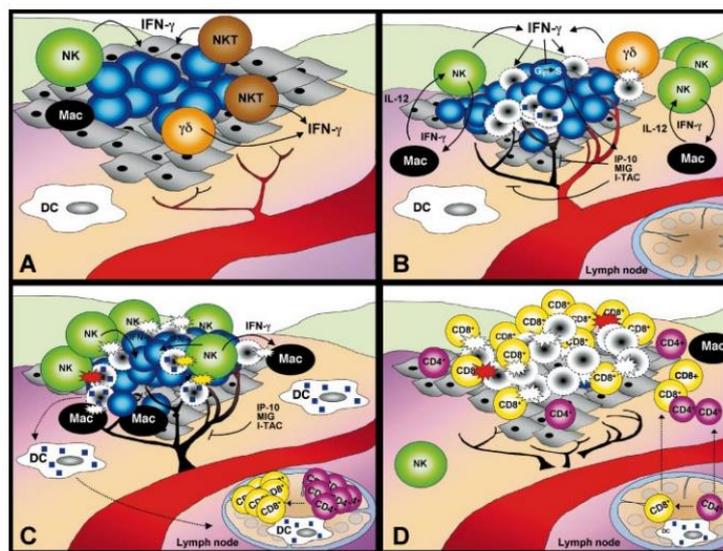
Fase ini mewakili proses yang dulunya merupakan konsep '*cancer immunosurveillance*', yang bila mampu mengeradikasi tumor yang berkembang, maka tumor tidak akan masuk ke fase selanjutnya. Komponen sistem imun yang terlibat dalam proses ini bisa berupa respon imun *innate* maupun adaptif. Inisiasi respon imun terhadap tumor muncul jika sel-sel dari sistem imun *innate* menyadari keberadaan dari sel-sel tumor, setidaknya sebagai akibat dari adanya gangguan terhadap jaringan lokal di sekitar sel tumor karena proses integral *stromal remodelling*. *Stromal remodelling* ini bisa terjadi akibat 2 proses yang merupakan bagian dari '*hallmark of cancer*' yaitu angiogenesis dan pertumbuhan invasif jaringan. Proses ini dapat menghasilkan molekul proinflamasi dan bersama-sama dengan kemokin yang dihasilkan oleh sel tumor akan menarik sel-sel sistem imun *innate* sebagai respon terhadap bahaya lokal ini. Selanjutnya sel tumor akan dikenali oleh sel *natural-killer T (NKT)*, sel  $\gamma \delta T$ , sel *natural-killer (NK)*, dan/atau makrofag melalui ligan untuk *NKG2D* yang telah diinduksi pada sel tumor akibat proses inflamasi maupun perubahan seluler. Selain itu, sel  $\gamma \delta T$  dan sel *NKT* dapat mengenali sel tumor melalui interaksi reseptor sel T (*TCR*) baik dengan ligan *Natural killer group 2 member D (NKG2D)*

ataupun kompleks *glikolipid-CD1*. Proses ini kemudian akan mengakibatkan dihasilkannya *interferon- $\gamma$*  (*IFN- $\gamma$* ) yang pada akhirnya akan menginduksi produksi lokal kemokin yang bahkan menarik lebih banyak lagi sel-sel sistem imun *innate* pada lokasi tumor. Sebagai tambahan, terdapat produk-produk yang dihasilkan selama proses remodel matriks ekstraseluler yang akan menginduksi makrofag di sekitar tumor untuk menghasilkan *interleukin-2* (*IL-2*) dalam jumlah minimal yang akan menstimulasi sel *NK* di sekitar tumor untuk menghasilkan sejumlah kecil *IFN- $\gamma$*  sehingga menyebabkan sistem umpan balik positif, makrofag menghasilkan lebih banyak *IL-2*, sel *NK* menghasilkan lebih banyak *IFN- $\gamma$* . Selain itu, ikatan antara sel *NK* dengan reseptor teraktivasi pada ligan di sel tumor lebih banyak lagi produksi *IFN- $\gamma$*  sehingga akan terjadi beberapa proses yang dependen terhadap *IFN- $\gamma$*  yaitu antiproliferatif, proapoptotik, dan angiostatik yang pada akhirnya akan membunuh sel-sel tumor. Makrofag yang teraktivasi oleh *IFN- $\gamma$*  akan menghasilkan produk-produk tumorisidal seperti *reactive oxygen (ROS)* dan *reactive nitrogen intermediates* dan sel *NK* yang teraktivasi dapat membunuh sel tumor melalui mekanisme *TRAIL*-atau yang tergantung pada *perforin*. Sebagai hasil akhir dari keseluruhan proses ini, antigen tumor yang berasal dari sel-sel tumor yang mati akan tersedia/muncul sehingga sistem imun adaptif bisa berespon lebih lanjut.

Selanjutnya adalah perkembangan respon imun adaptif yang spesifik terhadap tumor. Sel-sel dendritik (*DCs*) immatur yang ditarik ke tempat tumor akan teraktivasi karena paparan sitokin yang terbentuk saat penyerangan oleh sistem imun *innate* ataupun karena interaksi dengan sel-sel *NK* yang menginfiltrasi sel tumor. Sel dendritik yang teraktivasi bisa mendapatkan tumor antigen melalui mekanisme langsung dengan ingesti debris sel tumor dan melalui mekanisme tidak langsung yang melibatkan transfer protein *heat shock*/ kompleks tumor antigen terhadap *DCs*. Sel dendritik yang matur dan memiliki antigen ini kemudian bermigrasi ke kelenjar getah bening, lalu menginduksi aktivasi sel *T helper 1 (TH1)* *CD4* yang naif dan spesifik terhadap tumor yang kemudian akan memfasilitasi perkembangan sel sitotoksik *CD8* melalui presentasi silang peptida antigen tumor pada molekul *MHC* kelas 1 sel dendritik.

Sel *T CD4* dan *CD8* akan ke lokasi tumor kemudian akan berperan dalam pemusnahan sel tumor yang memiliki antigen. *CD4* akan memproduksi *IL-2*, dan bersama-sama dengan *IL-15* yang dihasilkan oleh sel pejamu akan membantu fungsi dan viabilitas dari sel *CD8*. Sel sitotoksik *CD8* akan mengenali target tumor secara efisien (karena peningkatan immunogenitas tumor akibat paparan *IFN-γ*) dan akan menginduksi pemusnahan sel tumor baik langsung maupun tidak langsung. Sepertinya sel *CD8* memusnahkan sel tumor secara langsung pada *in vivo*, namun juga akan menghasilkan banyak *IFN-γ* ketika

berinteraksi dengan sel tumor yang pada akhirnya akan menginduksi sitostatis dan pembunuhan sel tumor melalui mekanisme yang dependen terhadap *IFN- $\gamma$*  berupa penghambatan siklus sel, apoptosis, angiostatis, dan induksi aktivitas tumorisidal makrofag. Kedua aktivitas sel *CD8* ini timbul bersamaan, namun kontribusinya masing-masing bervariasi pada tumor yang berbeda. Karenanya fase eliminasi pada proses *cancer immunoeediting* adalah proses berkelanjutan dan terus berulang setiap kali terdapat sel-sel neoplastik yang berkembang. Sehingga dapat dimengerti bahwa kanker lebih sering pada usia dimana fungsi sistem imun (juga fungsi *cancer immunosurveillance*) turun.



Gambar 4. Fase Eliminasi sebagaimana yang dipaparkan oleh uraian di atas. Sel tumor berwarna biru, sel normal yang belum bertransformasi berwarna abu-abu (Dunn et al., 2002)

## B. Fase Equilibrium

Pada fase ini sistem imun pejamu dan sel tumor yang selamat dari fase eliminasi memasuki *equilibrium* yang dinamis, dimana sel-sel limfosit

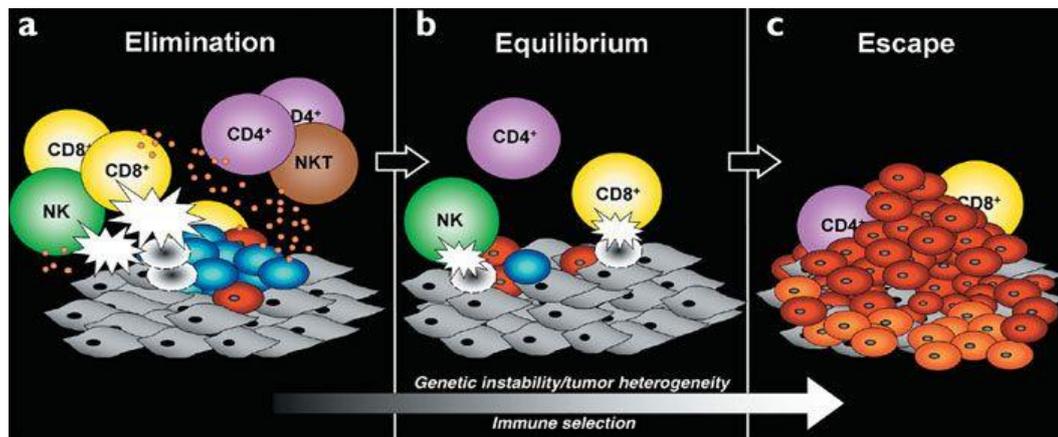
dan *IFN-γ* memberikan tekanan secara terus-menerus terhadap sel tumor namun tidak dapat dieliminasi sepenuhnya, yang terdiri dari sel tumor yang bermutasi dan tidak stabil secara genetik. Periode ini mengikuti pola seleksi Darwin, meskipun banyak sel tumor original yang dihancurkan, tetapi muncul varian baru dengan mutasi yang berbeda yang meningkatkan resistensinya terhadap respon imun. Hasil akhir dari fase ini adalah populasi baru klon tumor dengan immunogenitas yang berkurang, berasal dari populasi parental yang heterogen akibat manipulasi dari sistem imun. Periode ini mungkin yang paling lama berlangsung, bahkan diperkirakan bahwa pada beberapa tumor solid, interval antara paparan pertama terhadap karsinogen dan munculnya tumor yang bisa dideteksi secara klinik bisa mencapai 20 tahun. Selama periode ini, kemungkinan yang paling utama menyebabkan sel tumor bisa resisten terhadap respon imun pejamu adalah heterogenitas dan ketidakstabilan genetik dari sel-sel kanker tersebut. Sejauh ini telah dikemukakan bahwa "*mutator phenotype*" dari sel tumor bisa merupakan hasil dari ketidakstabilan genetik pada kanker, yaitu: *nucleotide-excision repair instability (NIN)*, *microsatellite instability (MIN)*, dan *chromosomal instability (CIN)*. Dari ketiganya, *CIN* dianggap sebagai mekanisme yang paling dominan yang bertanggung jawab terhadap ketidakstabilan integritas genom. Telah jelas bahwa ketidakstabilan genomik ini yang memiliki potensi membentuk varian sel tumor dengan immunogenitas yang kurang dan beberapa akan menunjukkan kemampuan yang lebih

baik untuk bertumbuh dalam lingkungan imun yang tidak terkendali lagi. Pemahaman menyeluruh terhadap fase ini memerlukan pengembangan model tumor baru untuk memperlihatkan mekanisme intrinsik sel yang memunculkan fenotip tumor baru dan untuk mengidentifikasi pemanipulasi sistem imun tumor (*'editors'*)

### C. Fase Escape

Pada fase ini, varian sel tumor yang telah diseleksi pada fase equilibrium sebelumnya bisa berkembang dalam lingkungan dengan sistem imun yang intak. Adanya defek dari sistem imun ini kemungkinan besar muncul ketika perubahan genetik dan epigenetik membuat sel tumor resisten terhadap deteksi dan/atau eliminasi sistem imun, yang membuat tumor dapat meluas dan bisa dideteksi secara klinis. Sistem imun *innate* dan adaptif berperan dalam merespon sel tumor dan sel tumor dapat memanipulasi salah satu atau keduanya agar bisa berkembang secara progresif. Sel-sel tumor individual bisa memiliki beberapa kemampuan/strategi untuk lolos dari sistem imun. Karenanya, sepertinya terdapat beberapa kejadian manipulasi imun yang berbeda sebelum terbentuk fenotip immunogenik dari sel kanker. Telah banyak penelitian dilakukan yang berfokus pada dasar molekuler dari lolosnya tumor dari sistem imun pejamu. Tumor dapat secara langsung maupun tidak langsung menghambat perkembangan respon antitumor baik melalui elaborasi sitokin immunosupresif (seperti *TGF- $\beta$*  dan *IL-10*) atau melalui mekanisme yang melibatkan sel T dengan kemampuan

immunosupresif (seperti sel *T-regulatory (Treg)*). Mekanisme *escape* ini juga bisa akibat perubahan langsung yang terjadi pada sel tumor, dapat berupa perubahan yang berefek pada proses pengenalan tumor oleh sel efektor sistem imun (seperti hilangnya ekspresi antigen, hilangnya komponen *MHC*, proses *shedding* ligan *NKG2D*, dan adanya insensitivitas *IFN-γ*), atau tumor memiliki mekanisme untuk menghindari destruksi oleh sistem imun (seperti defek pada jalur sinyal *death-receptor* atau ekspresi sinyal antiapoptotik misalnya yang diinduksi oleh *STAT3*). Hal ini didukung oleh beberapa penelitian. Analisis terhadap sejumlah besar spesimen tumor manusia menunjukkan bahwa 40%-90% terdapat kehilangan alel protein *HLA* kelas 1 baik total ataupun selektif. Penelitian lain menunjukkan 4/17 (25%) *cell line* adenokarsinoma paru pada manusia tidak responsif terhadap *IFN-γ*. Keadaan tidak responsif ini terjadi akibat tidak ada atau abnormalitas dari fungsi komponen tertentu jalur sinyal reseptor *IFN-γ*.



Gambar 5. Tiga fase 'cancer immunoediting' terdiri dari fase *elimination*, *equilibrium*, dan *escape*. Pada a dan b : sel-sel tumor yang sedang berkembang (biru), varian sel tumor (merah), stroma dan sel-sel yang tidak bertransformasi (abu-abu). Pada c : varian tambahan dari tumor (oranye) yang terbentuk dari fase *equilibrium*. Lingkaran kecil berwarna oranye menandakan sitokin, dan *flashes* putih menandakan aktivitas sitotoksik limfosit melawan sel tumor. (Dunn et al., 2002).

### II.4.3. Tumour-Infiltrating Lymphocytes (TILs)

Mekanisme pertahanan anti tumor lokal menggambarkan perkembangan dan organisasi dari lingkungan mikro tumor. Komposisi dari populasi sel dan proporsi relatif dari adanya sel-sel inflamasi pada area ini memberikan efek pada kualitas dan karakteristik dari respon inflamasi. Limfosit yang ditemukan langsung pada area tumor dikenal dengan sebutan *tumour-infiltrating lymphocytes* (TILs) (Jakubowska et al., 2017). TILs terdiri dari subset limfosit dengan proporsi yang berbeda, antara lain sel T CD8+, sel T CD4+, sel *Natural Killer* (NK), dan sel B, dimana sel limfosit T dianggap sebagai bagian yang paling dominan pada lingkungan mikro tumor dan memiliki peran utama dalam respon imun anti-tumor. Subtipe limfosit T sebagai bagian dari TILs memiliki peranan tersendiri dalam lingkungan mikro tumor. Sel T CD8+ akan mengenali dan dapat membunuh secara langsung sel-sel tumor yang mengekspresikan peptida yang berasal dari antigen tumor dan dipresentasikan pada molekul *major histocompatibility*

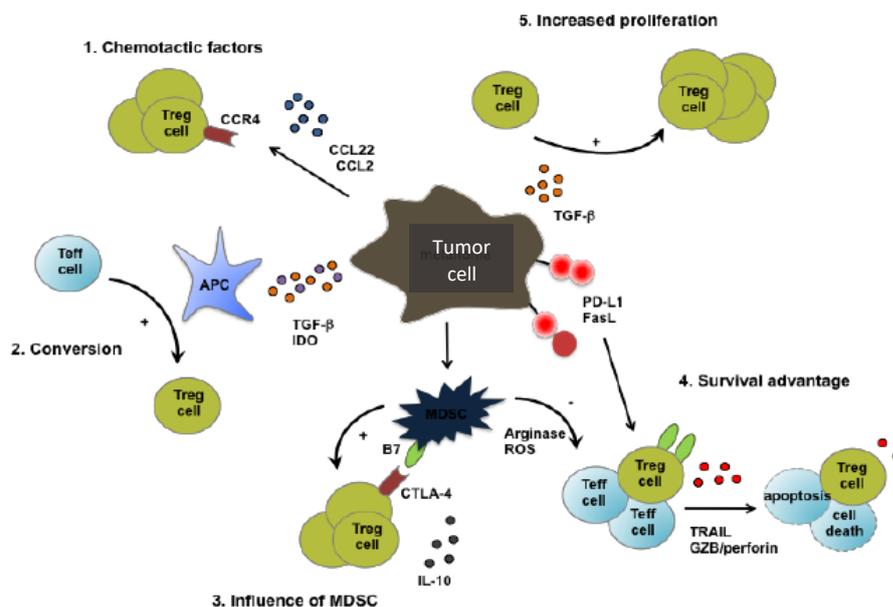
*complex* (MHC) kelas I. Adapun sel T *helper* CD4+ akan membantu mengaktifkan sel T CD8+ untuk menekan pertumbuhan tumor. Sementara sel T regulator (Treg), merupakan salah satu subtype dari sel T yang dapat menekan respon imun anti-tumor dengan menghambat aktivitas sel T CD8+. (Zgura et al., 2018; Abbas et al., 2017; Cimino-Mathews et al., 2015).

*Tumour-infiltrating lymphocytes* (TILs) telah dilaporkan berhubungan dengan hasil klinis pasien di sejumlah tumor ganas yang berbeda, termasuk karsinoma payudara. Ali *et al* dalam penelitiannya memperoleh hasil bahwa adanya infiltrat sel T pada tumor secara independen berhubungan dengan penurunan resiko relatif dari kematian (Ali et al., 2014). Hal ini sejalan dengan penelitian Loi *et al* yang menyatakan bahwa pasien dengan derajat TILs yang tinggi memiliki kelangsungan hidup yang sangat baik (Loi, 2019).

#### **II.4.4. Limfosit T Regulator (FOXP3)**

*Forkhead box Protein 3* (FOXP3) gen X-linked adalah anggota dari keluarga faktor transkripsi forkhead/winged-helix yang terlibat dalam perkembangan dan fungsi regulasi sistem imun (Takenaka, 2013). Gen FOXP3 manusia terletak pada kromosom X lengan pendek (Xp11.23), yang dapat digunakan sebagai biomarker spesifik untuk identifikasi Treg dalam infiltrat inflamasi pada penderita kanker dan penyakit autoimun. Treg sangat penting untuk pemeliharaan toleransi diri. Sel ini memainkan peran dalam toleransi imun terhadap sel-sel tumor dengan beberapa mekanisme, termasuk menghambat efektor limfosit sel T sitotoksik secara reversibel dengan mengganggu pelepasan granula sitotoksik oleh sel T CD8+, sehingga

menghambat lisis sel target. Penghindaran yang efektif dari sistem kekebalan oleh sel-sel tumor diperlukan selama onkogenesis, perkembangan tumor dan penyebaran metastasis. Peningkatan aktivitas Treg telah dikaitkan dengan respon imunologis yang buruk terhadap antigen tumor. Telah dilaporkan bahwa lingkungan mikro tumor mengandung banyak molekul yang mampu meningkatkan jumlah FOXP3 Treg melalui beberapa mekanisme, termasuk mendorong sel T helper CD4+ untuk berkembang menjadi FOXP3 Treg, merekrut FOXP3 Treg yang ada ke lokasi tumor dan mendorong ekspansi Treg. (Liu et al., 2014)



Gambar 6. Sel T regulator terakumulasi di lingkungan tumor tempat mereka mengatur tumor imun escape. (van Lint et al., 2013).

APC = antigen presenting cell, CCL-2 = chemokine ligand-2, CCR4 = C-C chemokine receptor 4, CTLA-4 = cytotoxic T lymphocyte-associated protein, GzB = granzyme B, IDO = indolamine 2,3-dioxygenase, IL= interleukin, MDSC = myeloid-derived suppressor cell, PDL-1 = programmed death ligand-1, ROS = reactive oxygen species, Teff = T effector cell, TGF-β = transforming growth factor beta, TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand, Treg = T regulatory cell.

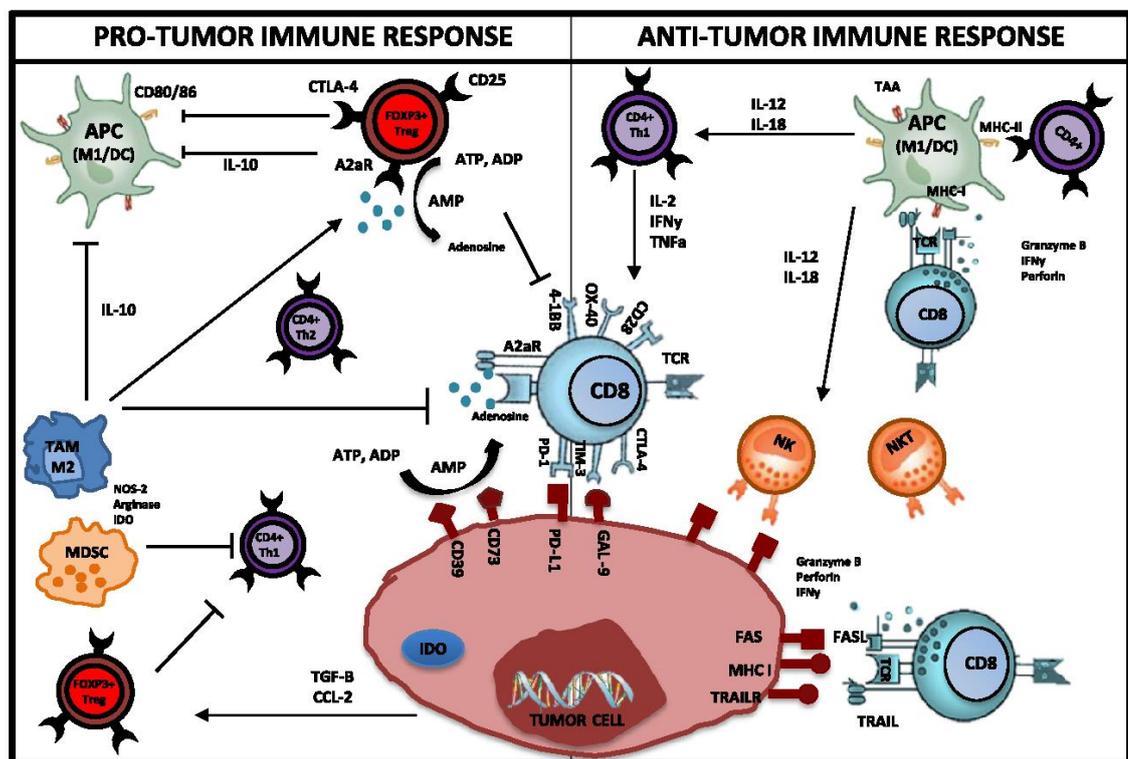
Mekanisme akumulasi jumlah sel T regulator di lingkungan mikro tumor di antaranya adalah : (1) Sel-sel tumor mensekresi faktor-faktor kemotaktik diantaranya kemokine yang berbeda seperti CCL2 dan CCL22, yang berikatan dengan CCR4, reseptor kemokine yang secara konstitutif sangat diekspresikan pada Treg. (2) Sekresi atau ekspresi mediator anti-inflamasi, TGF- $\beta$  dan IDO, dapat secara langsung atau tidak langsung melalui sel-sel imun yang berhubungan dengan tumor menginduksi konversi sel T efektor menjadi Treg. (3) Lingkungan mikro tumor menyimpan banyak MDSC yang secara aktif menekan aktivasi sel T antara lain dengan memproduksi arginase, ROS dan IL-10, dan interaksi dengan Treg, bahkan menginduksi Treg. (4) Pada tumor, Treg memiliki keunggulan ketahanan selektif dibanding sel T efektor karena sel tumor mengekspresikan ligan penginduksi kematian, seperti PD-L1 dan FasL, dan Treg sendiri dapat menginduksi mediator-reseptor (misalnya TRAIL atau ligan penginduksi apoptosis terkait TNF) atau deplesi sel T yang dimediasi oleh granzim/perforin. (5) Faktor-faktor seperti TGF- $\beta$  disekresikan secara lokal dalam tumor dan menyebabkan proliferasi Treg (van Lint et al., 2013).

Kim *et al* dalam penelitiannya memperoleh hasil adanya hubungan antara infiltrasi FOXP3 Treg dengan parameter klinikopatologi karsinoma payudara (indeks Ki-67, derajat histopatologi, status *hormone receptor* (ER/PR-), HER-2+ dan rekurensi tumor), yaitu peningkatan infiltrasi FOXP3 Treg berhubungan dengan parameter klinikopatologi yang buruk. Penelitian tersebut juga mengkonfirmasi bahwa peningkatan infiltrasi FOXP3 Treg

berhubungan dengan prognosis yang buruk terhadap 5-year disease-free survival rate pasien (Kim et al., 2014).

Beberapa penelitian juga telah menunjukkan bahwa peningkatan infiltrasi FOXP3 Treg berkaitan dengan grading tumor yang lebih tinggi, *survival free-relaps* yang lebih pendek, dan *overall survival* yang buruk pada pasien karsinoma payudara. Derajat FOXP3+ TIL merupakan faktor prognostik yang menjanjikan pada kanker payudara (Cimino-Mathews et al., 2015; Shou et al., 2016).

#### II.4.5. TILs dan FOXP3 T Regulator Pada Karsinoma Payudara



Gambar 7. Interaksi antara lingkungan mikro imun dan sel tumor pada kanker payudara. A2aR = A2A adenosine receptor, ADP = adenosine difosfat, AMP = adenosine monofosfat, APC = antigen presenting cell, ATP = adenosine trifosfat, CCL-2 = chemokine ligand-2, CTL = cytotoxic T lymphocyte, CTLA-4 = cytotoxic T lymphocyte-associated protein, DC = dendritic cell, FAS = fatty-acid synthase, GAL-9 = galectin-9, IDO = indolamine 2,3-dioxygenase, IFNγ = interferon gamma, IL= interleukin, M1/M1 TAM = tumor-associated macrophage, MDSC = myeloid-derived suppressor cell, MHC = major histocompatibility complex, NK = natural killer,

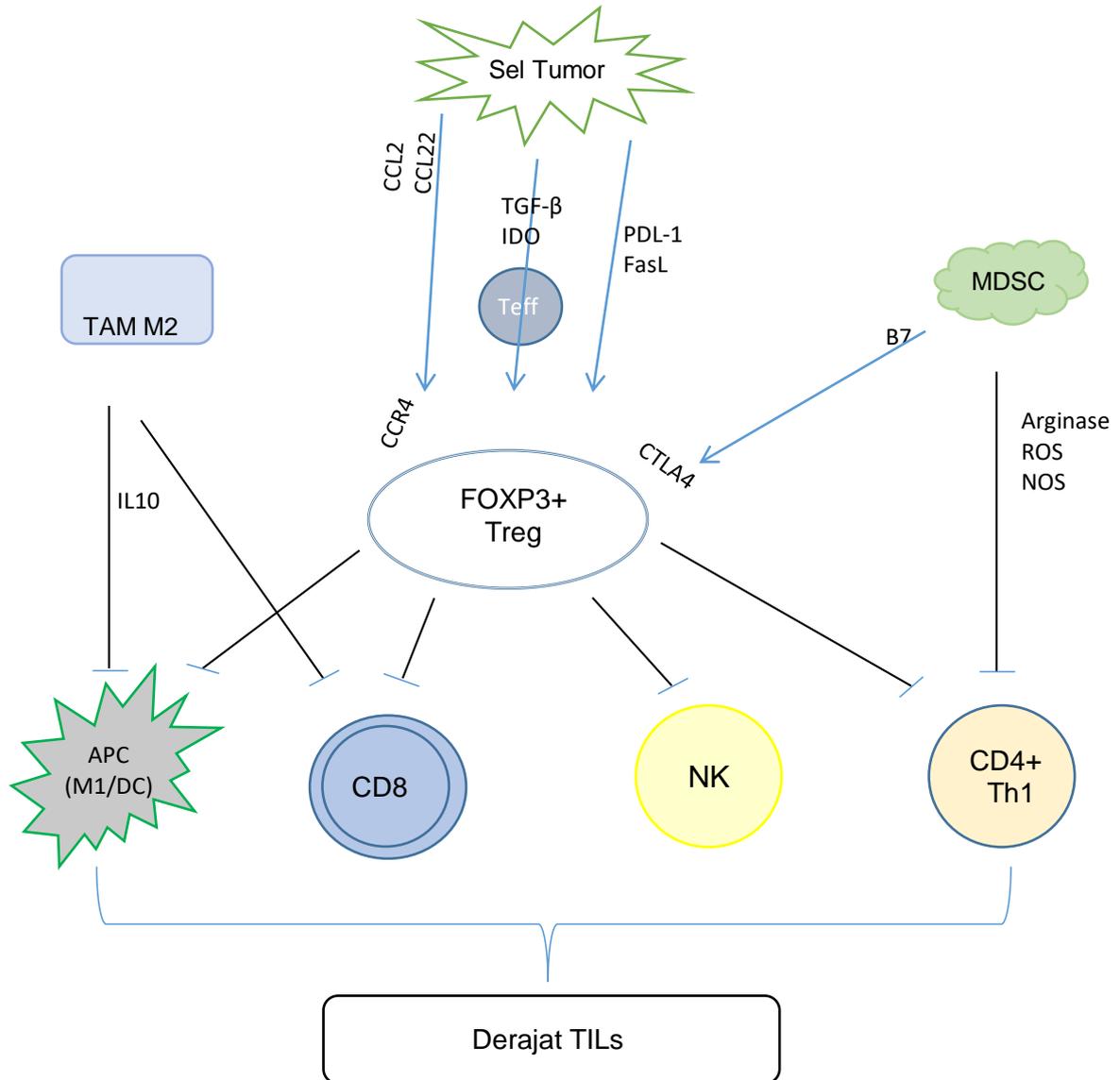
NKT = natural killer T-cell, NOS = nitric oxide synthase, PD-1 = programmed death-1, ROS= reactive oxygen species, TAA = tumor-associated antigen, TCR = T-cell receptor, TGF- $\beta$  = transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = tumor necrosis factor alpha, TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand, Treg = T regulatory cell. (Dusyanthen, 2015)

Respon imun anti tumor tergantung pada produksi CD4+ (Th1) IFN $\gamma$  yang memediasi ekspansi, diferensiasi dan aktivasi CD8+ tumor spesifik. Sel T sitotoksik CD8+ menginduksi lisis sel melalui pengenalan TAA spesifik, seperti MHC, FAS dan TRAIL pada permukaan sel kanker/APC. Demikian pula, sel T CD4+ mampu mengenali MHC II pada APC. Sebagai hasil dari pembentukan kompleks (TCR-MHC/Peptide) ini, granzim, IFN $\gamma$ , dan perforin dilepaskan dari CTL, menghasilkan eksositosis granul dan kematian sel melalui apoptosis. Sel NK dan NKT dengan bantuan APC (DC/M1) dan CD4+ Th1 mampu mengenali dan mengeliminasi sel tumor. (Dusyanthen et al., 2015)

Dalam lingkungan pro-tumor, CTLA-4, TIM-3 dan PD-1 memberikan signal inhibisi sebagai akibat dari kelelahan/anergi sel T yang disebabkan oleh aktivasi yang berkepanjangan. CTLA-4 secara negatif mengatur aktivasi sel T selama fase 'priming' respon sel T. PD-1 diekspresikan pada sel T dalam fase efektor dari respon sel T berikatan dengan ligannya PDL-1, diekspresikan dalam lingkungan mikro tumor. Hal ini menghasilkan penghambatan aktivitas sel T (apoptosis). FOXP3+ sel Treg memainkan peran penting selama seleksi sel T CD8+ aviditas tinggi, mengurangi fungsionalitasnya. Treg juga memiliki aksi penghambatan pada APC, sel T CD8+, sel NK dan sel T CD4+ Th1. Treg dan sel tumor menghasilkan adenosin, yang memiliki efek penghambatan pada sel T. Sel-sel tumor

dapat mengeluarkan sitokin dan kemokin (misal TGF- $\beta$ , CCL2) yang merekrut dan menstimulasi sel-sel supresif seperti Treg, MDSC dan makrofag M2. Makrofag M2 dan MDSC menghambat respon sel T melalui penyerapan nutrisi melalui generasi arginase, ROS dan NOS. Upregulasi enzim immunosupresif seperti IDO dan arginase mengkatabolisasi nutrisi penting yang diperlukan untuk aktivasi sel efektor. Lebih jauh, sel-sel tumor menurunkan regulasi molekul MHC, kehilangan ekspresi molekul antigenic dan meningkatkan regulasi molekul penghambat seperti PDL-1, menyebabkan pengenalan imun terhambat dan dengan demikian memungkinkan imun escape dan perkembangan kanker. (Dusyanthen et al., 2015).

## II.5. Kerangka Teori



## **BAB III KERANGKA KONSEP**

### **III.1. Identifikasi Variabel**

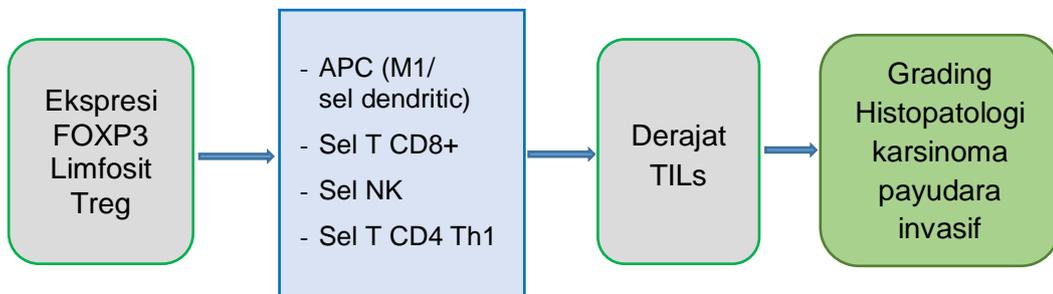
Pada penelitian ini terdapat 4 (empat) variabel, yaitu :

1. Ekspresi FOXP3 limfosit Treg
2. Derajat TILs
3. Grading histopatologi karsinoma payudara invasif
4. APC (M1/ Sel Dendritik), sel T CD8+, Sel NK, Sel CD4 Th1.

### **III.2. Klasifikasi Variabel**

1. Jenis variabel berdasarkan skala pengukuran, yaitu :
  - a. Ekspresi FOXP3 limfosit Treg : variabel ordinal
  - b. Derajat TILs : variabel ordinal
  - c. Grading Histopatologi karsinoma payudara invasif : variabel ordinal
2. Peran variabel berdasarkan fungsinya, yaitu :
  - a. Variabel bebas : Ekspresi FOXP3 limfosit Treg, Derajat TILs.
  - b. Variabel tergantung : Grading histopatologi karsinoma payudara invasif
  - c. Variabel antara : APC (M1/ Sel Dendritik), sel T CD8+, Sel NK, Sel CD4 Th1

### III.3 Kerangka Konsep



Keterangan :

Variabel bebas

Variable tergantung

Variabel antara