

DISERTASI

**ANALISIS HUBUNGAN EKSPRESI GEN HIF-1, VEGF,
KADAR KI67 DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
JARINGAN PAYUDARA MENCIT BALB/C YANG DIINDUKSI
DMBA DAN ANTIVEGF**

**ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN GENE
EXPRESSION OF HIF-1, VEGF, KI67 LEVELS AND
HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN BALB/C MICE THAT
WERE INDUCED WITH DMBA AND ANTI-VEGF**



SUGIARTO
C013191039

PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HASANUDDIN

2024

DISERTASI



DISERTASI

ANALISIS HUBUNGAN EKSPRESI GEN HIF-1, VEGF, KADAR KI67 DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN PAYUDARA MENCIT BALB/C YANG DIINDUKSI DMBA DAN ANTI VEGF

ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN GENE EXPRESSION OF HIF-1, VEGF, KI67 LEVELS AND HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN BALB/C MICE THAT WERE INDUCED WITH DMBA AND ANTI-VEGF

Disusun dan diajukan

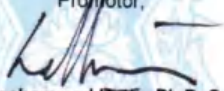
Oleh

Sugiarto
C013191039

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 20 Februari 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

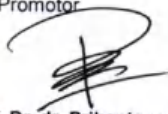
Menyetujui

Promotor,


Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Nip. 19570416 198503 1 001

Co. Promotor

Co. Promotor

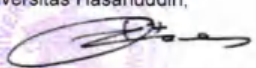

Prof. Dr. dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk, M.Kes
Nip. 19740629 200812 1 001


Prof. dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)
Nip. 19740330 20050 1 2001

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001



ABSTRAK

SUGIARTO. *Analisis Hubungan Ekspresi Gen HIF-1, VEGF, Kadar Ki67 dan Gambaran Histopatologi pada Mencit Balb/C yang Diinduksi dengan Dmba dan Antivegf* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Prihantono, dan Upik A. Miskad).

Penelitian ini bertujuan menganalisis hubungan ekspresi HIF-1, VEGF, dan kadar Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi oleh zat 7.12-dimetilbenz[*a*]anthracene (DMBA) disertai gambaran histopatologi jaringan payudara. Penelitian dilakukan menggunakan mencit BALB/c yang terdiri atas tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok induksi DMBA, dan kelompok induksi DMBA- anti-VEGF. Penilaian ekspresi HIF-1, VEGF pre dan post induksi DMBA, dan efek anti-VEGF dilakukan dengan cara *real-time* PCR. Kadar protein Ki67 diperiksa dengan ELISA. Analisis hubungan ekspresi ketiganya dilakukan secara statistik. Normalitas data diuji dengan uji Shapiro-Wilk. Perbedaan ketiga ekspresi untuk dua kelompok diuji dengan uji T tidak berpasangan dan *one-way* ANOVA untuk tiga kelompok. Dinamika perubahan ekspresi akan diuji dengan uji T berpasangan, sedangkan pemeriksaan histopatologi proliferasi dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopik potongan blok paraffin jaringan payudara yang telah diwarnai *hematoksin-eosin*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen HIF-1, mRNA gen VEGF, dan kadar protein Ki67 meningkat bermakna pada kelompok induksi DMBA dibandingkan dengan kelompok tidak diinduksi ($p < 0,001$). Penurunan ekspresi ketiganya secara bermakna terjadi saat diberikan anti-VEGF ($p < 0,001$). Gambaran proliferasi sel secara mikroskopik tampak lebih nyata pada kelompok mencit yang diinduksi DMBA dibandingkan dengan kelompok yang diberikan anti-VEGF. Penelitian ini membuktikan pengaruh DMBA yang meningkatkan ekspresi HIF-1, VEGF, dan kadar protein K167 secara bermakna dengan gambaran histologik proliferasi sel yang lebih nyata. Pemberian anti-VEGF dapat memengaruhi penurunan ekspresi HIF-1, VEGF, dan kadar Ki67. Gambaran proliferasi sel terlihat secara mikroskopik setelah pemberian DMBA dan/atau anti-VEGF.

Kata kunci: ekspresi HIF-1, VEGF, kadar Ki67, DMBA, anti-VEGF, proliferasi sel



ABSTRACT

SUGIARTO. *An Analysis of the Correlation Between Gene Expression of Hif-1, Vegf, Ki67 Level, and Histopathological Features in Balb/C Mice Induced with Dmba and Anti-Vegf* (Supervised by Mochammad Hatta, Prihantono, and Upik A. Miskad)

The aim of this study is to analyze the correlation between the expression of HIF-1, VEGF, and Ki67 levels in Balb/c mice induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) along with histopathological images of breast tissue. The study used three groups of BALB/c mice, i.e. control group, DMBA induction group, and DMBA-antiVEGF induction group. The assessment of expression of HIF-1, VEGF pre and post DMBA induction, and antiVEGF effects used Real-Time PCR. Ki67 protein level was examined using ELISA. The analysis of the correlation between the three expressions was carried out statistically. The assessment of normality of expression data was tested using the Shapiro-Wilk test. Differences in the three expressions for two groups were tested using unpaired T Test and One-Way ANOVA for three groups. The dynamics of expression changes was tested using the paired T test, while histopathological examination of proliferation was carried out by microscopic examination of paraffin block sections of breast tissue that had been stained with hematoxylin-eosin. The results show that HIF-1 gene mRNA expression, VEGF gene mRNA, and Ki67 protein levels increase significantly in the DMBA induction group compared with the non-induced group ($p < 0.001$). A significant decrease in the expression of all three occurs when antiVEGF is given ($p < 0.001$). Microscopic features of cell proliferation appear more obvious in the group of mice induced with DMBA compared to the group given antiVEGF. This study proves the effect of DMBA which significantly increases the expression of HIF-1, VEGF, and Ki67 protein levels with a more obvious histological picture of cell proliferation. Administration of antiVEGF can affect the reduction of HIF-1, VEGF expression, and Ki67 levels. Cell proliferation is visible microscopically after administration of DMBA and/or antiVEGF.

Keywords: HIF-1 expression, VEGF, Ki67 levels, DMBA, AntiVEGF, cell proliferation





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010, 585836, 586200 Psw. 2767 Fax. (0411) 586297

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Sugiarto**
Nomor Pokok : C013191039
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul : **Analisa Hubungan Ekspresi Gen HIF-1, VEGF, ekspresi Protein Ki67 Dan Gambaran Histopatologi Pada Mencit Balb/c yang Diinduksi dengan DMBA dan AktiVEGF**

Adalah karya tulis saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar- benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 13 Juni 2023
Yang menyatakan,



Sugiarto



**ANALISA HUBUNGAN EKSPRESI GEN HIF-1, VEGF,
KADAR KI67 DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
PADA MENCIT BALB/C YANG DIINDUKSI DENGAN
DMBA DAN ANTI VEGF**

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
S3 Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

**SUGIARTO
C013191039**

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024



Abstrak

Objektif: Hipoksia sel dapat ditemukan pada proliferasi sel yang tidak terkendali disertai proses angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa hubungan ekspresi HIF-1, VEGF dan kadar Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi zat 7,12-dimetilbenz [a] anthracene(DMBA) disertai gambaran histopatologi jaringan payudara. **Metode:** Penelitian menggunakan mencit BALB/c 3 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok induksi DMBA dan kelompok induksi DMBA- antiVEGF. Penilaian ekspresi HIF-1, VEGF pre dan post induksi DMBA maupun efek antiVEGF dengan cara Real-Time PCR disertai kadar protein Ki67 dengan cara ELISA. Analisa hubungan ekspresi ketiganya dilakukan secara statistic. Normalitas data diuji dengan uji Shapiro-Wilk. Perbedaan ketiga ekspresi untuk dua kelompok diuji dengan Uji T tidak berpasangan dan One-Way ANOVA untuk tiga kelompok. Dinamika perubahan ekspresi akan diuji dengan uji T berpasangan sedangkan pemeriksaan histopatologi proliferasi dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopik dari sediaan Hematoksin-Eosin slide histopatologi jaringan payudara. **Hasil:** Ekspresi mRNA gen HIF-1, mRNA gen VEGF, dan kadar Protein Ki67 meningkat bermakna pada kelompok induksi DMBA dibandingkan dengan kelompok tidak diinduksi ($p < 0,001$). Penurunan ekspresi ketiganya secara bermakna terjadi saat diberikan antiVEGF ($p < 0,001$). Gambaran proliferasi sel secara mikroskopik tampak lebih nyata pada kelompok mencit yang diinduksi DMBA dibandingkan kelompok yang diberikan antiVEGF. **Kesimpulan:** Penelitian ini membuktikan pengaruh DMBA yang meningkatkan ekspresi HIF-1, VEGF dan kadar protein KI67 secara bermakna disertai proliferasi sel secara histologik. Penurunan ekspresi HIF-1, VEGF, kadar Ki67 dan proliferasi sel secara mikroskopik dapat terjadi akibat pemberian antiVEGF.

Kata Kunci: Ekspresi HIF-1, VEGF, kadar Ki67, DMBA, AntiVEGF, proliferasi sel



Abstract

Objective: Cell hypoxia can be found in uncontrolled cell proliferation accompanied by the angiogenesis process. This study aims to analyze the relationship between the expression of HIF-1, VEGF and Ki67 levels in Balb/c mice induced by 7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) along with histopathological images of breast tissue. **Method:** The study used 3 groups of BALB/c mice, namely the control group, the DMBA induction group and the DMBA-antiVEGF induction group. The expression of HIF-1, VEGF pre and post DMBA induction and anti-VEGF effects was assessed using Real-Time PCR and Ki67 protein levels by using ELISA. Analysis of the relationship between those three expressions was carried out statistically. Data normality was tested using the Shapiro-Wilk test. Differences in the three expressions for two groups were tested using unpaired T Test and One-Way ANOVA for three groups. The expression changes will be tested using the paired T test, while histopathological examination of proliferation will be carried out by microscopic examination of Hematoxylin-Eosin histopathological slides of breast tissue.

Results: HIF-1 gene mRNA expression, VEGF gene mRNA, and Ki67 protein levels increased significantly in the DMBA induction group compared with the non-induced group ($p < 0.001$). A significant decrease in the expression of all three occurred when antiVEGF was given ($p < 0.001$). Microscopic features of cell proliferation appeared more obvious in the group of mice induced by DMBA compared to the group given antiVEGF.

Conclusion: This study proves the effect of DMBA which significantly increases the expression of HIF-1, VEGF and Ki67 protein levels followed by histological cell proliferation. Decreased expression of HIF-1, VEGF, Ki67 levels and microscopic cell proliferation might occur due to anti-VEGF administration.

Keywords: HIF-1 expression, VEGF, Ki67 levels, DMBA, AntiVEGF, cell proliferation.



PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Kami mengucapkan Alhamdulillah kehadirat Allah Subhana wata'Ala yang telah memberikan segala nikmat yang telah diberikan baik berupa iman, taufik dan hidayahNya dan khususnya hari ini kami sampai dapat menyelesaikan laporan disertasi ini dengan judul *Analisa Hubungan Ekspresi Gen HIF-1, VEGF, kadar Ki67 dan Gambaran Histopatologi Jaringan Payudara Mencit Balb/c yang Diinduksi DMBA dan anti VEGF*. Tugas disertasi ini merupakan salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Pada kesempatan yang berbahagia ini kami sangat menyadari bahwa penyusunan disertasi ini masih jauh dari sempurna dan masih dapat ditemukan kekurangan-kekurangan pada isi disertasi ini, sehingga penulis sangat mengharapkan segala kritikan, saran maupun masukan yang membangun untuk perbaikan hasil penyusunan lebih optimal.

Kemudian pula pada kesempatan ini, yang sangat ingin kami

an setelah penyelesaian tugas akhir penyusunan disertasi ini

capkan rasa terima kasih dengan sepenuh hati kepada :



1. Universitas Muhammadiyah Jakarta yang telah memberikan kesempatan mengikuti program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana.
2. Tim Promotor penulis: yang terdiri dari ketua Tim Promotor Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D. Sp. MK(K), yang telah dengan tekun dan sabar bersedia membimbing penulis sebagai mahasiswa bimbingan pada Prodi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, baik dalam memberikan ilmu, inspirasi, motivasi serta keluangan waktu / kesempatan selama masa studi terutama saat riset dan penyelesaian disertasi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Co-Promotor yang terdiri dari Prof.dr. Prihantono, Sp.B(K) Onk. Mkes dan Prof.dr. Upik A.Miskad, Ph.D, Sp.PA(K), M.Kes yang disamping banyak tugas lainnya masih tetap meluangkan waktu untuk membimbing, berdiskusi, memberikan ilmu maupun arahan dan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas studi dan penulisan disertasi ini.
3. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin;
4. Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin;
5. Prof. Dr.dr.Haerani Rasyid, Sp.PD, Sp.GK selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin;
6. dr. Irfan Idris, M.Kes., Ph.D selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin;



7. Seluruh Tim penguji: Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed ; Dr.dr. Rina Masadah, Sp.PA(K), M.Phil.DFM; Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D,Sp.Biok; dr. Cahyono Kaelan, Ph.D,Sp.PA(K),Sp.S dan Dr.dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes atas waktu dan kesempatannya dalam menguji serta bimbingan dan masukannya sehingga perbaikan disertasi ini menjadi lebih baik.
8. Dr.dr. Primariadewi Rustamadji, Sp.PA(K), selaku penguji eksternal dari Fakultas kedokteran Universitas Indonesia
9. Dr.dr. Tri Ariguntar,Sp.PK selaku Dekan FKK UMJ dan istimewa kepada Kak Dr.dr. Farsida,MPH dan juga tidak lupa kepada Ibu Dr. Fatimah,SST,MKM selaku manta Wakil Dekan II Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Jakarta atas dukungannya secara moril dan materil kepada penulis.
10. Staf Laboratorium Biologi Molekular dan Imunologi Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin (Bapak Wani dan tim), Staf Laboratorium Patologi Anatomi RS. Unhas (Ibu Tati dan staf Laboratorium Patologi Anatomi), para analis di Laboratorium PA RSPP (pak Heri Setiayawan, Mbak Desti Iryani, Mbak Irma dan Mbak Anik)
11. Tim penasehat lainnya Dr. dr. Najda Hidayah dan Rike Syahniar, M.Biomed atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian dan atau untuk penulisan manuskrip untuk publikasi.



12. Staf Prodi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin (Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd.FT dan Bapak Rahmat) atas bantuannya tenaga dan motivasi selama penulis menjalani masa studi.
13. Terkhusus juga untuk teman-teman sejawat istimewa yang selalu kompak di Departemen Patologi Universitas Muhammadiyah Jakarta (dr. Prabowo, Sp.PA; dr. Mieke Marindawati, Sp.PA, dr. Fita Ferdiana, Sp.PA dan dr. Litta, Sp.PA) yang selalu memberikan dorongan semangat untuk menyelesaikan studi ini dengan baik.
14. Teman-teman Dosen pengajar dan staf kependidikan di Fakultas Kedokteran Dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Jakarta
15. Semua teman-teman seperjuangan terutama Angkatan 2019 di program studi S3 Ilmu Kedokteran, yang selalu memberikan motivasi, dorongan, dan informasi-informasi kepada peneliti sehingga peneliti dimudahkan selama masa studi.
16. Semua pihak yang kami tidak bisa sebutkan satu persatu yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, berkenaan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya disertasi ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian, yaitu kepada subjek penelitian yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Ucapan terimakasih teristimewa dan tersayang ditujukan kepada

g tua penulis yang telah mendahului kami (Almarhum Ibunda
nta Ibunda Waginah dan Almarhum .Ayanda Ponikin) dan



seterusnya kepada kakanda Siswanto, almarhum kakanda Sarwono dan keluarga , adik-adikku, Sri Pangastuti dan Sri Mulyani beserta keluarga, penulis mengucapkan terima kasih untuk inspirasi, motivasi, dukungan baik secara moril dan materiel dan doa yang tidak pernah putus senantiasa dipanjatkan kepada Allah SWT.

Untuk Istriku tercinta, Eka Bozana yang tidak kenal lelah, tulus, sabar, perhatian, cinta dan kasih sayang mendampingi, memotivasi serta berdoa untuk penulis selalu sehingga sampai di ujung perjuangan studi. Seterusnya tentu untuk putra putri tercintaku, Syauqi Rahmat, Syahidah Nabilla, Salman Luthfi, Sabrina Najma Ulya, Sayid Yusuf, Sayid Utsman, Syafiq dan Shaquile yang menjadi pengobat lelah, sumber kebahagiaan serta menjadi penyemangat jiwa dan fisik penulis untuk menyelesaikan studi ini dengan semangat dimana doa-doa keluarga besar kami senantiasa tercurahkan kepada penulis terutama selama masa studi.

Penulis berharap semoga penulisan disertasi ini dapat bermanfaat dan menjadi motivasi untuk kemajuan civitas akademik kampus tercinta ini dan masyarakat diluar kampus yang pembacanya.

Makassar, Februari 2024

Sugiarto



**ANALISIS HUBUNGAN EKSPRESI GEN HIF-1, VEGF DAN KADAR
PROTEIN KI67 DISERTAI GAMBARAN HISTOPATOLOGI PADA
MENCIT BALB/C YANG DIINDUKSI DMBA DAN PEMBERIAN ANTI
VEGF**

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
S3 Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

SUGIARTO

C013191039

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024



PANITIA PENILAI DISERTASI

Promotor : Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, SpMK(K)
Kopromotor : Prof.dr.Upik A.Miskad,PhD,Sp.PA(K)
Kopromotor : Prof.Dr. dr Prihantoro Sp.B.Onk(K),M.Kes
Penguji Eksternal : Dr. dr. Primariadewi Rustamadji, Sp.PA (K)

Penilai : Prof. dr. Budu,Ph.D,Sp.M(K),M.Med.Ed
Dr. dr. Rina Masadah,Sp.PA(K),M.Phil. DFM
Prof. dr. Rosdiana, Natzir,Ph.D,Sp.Biok
dr. Cahyono Kaelan,,Ph.D,Sp.PA,Sp.S
Dr. dr. Ilham JayaPatellongi,M.Kes



DAFTAR ISI

ABSTRAK	VII
PRAKATA	IX
PANITIA PENILAI DISERTASI	XIVI
DAFTAR ISI	XVI
DAFTAR SINGKATAN	XXII
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. RUMUSAN MASALAH	7
C. HIPOTESIS	8
D. TUJUAN PENELITIAN.....	8
1. Tujuan umum	8
2. Tujuan khusus	8
E. MANFAAT PENELITIAN	9
1. Kegunaan Ilmiah	9
2. Kegunaan Praktis	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	11
A. ANATOMI, HISTOLOGI DAN FISILOGI PAYUDARA.....	11
1. Anatomi Payudara	11
2. Histologi Payudara	11
3. Fisiologi Payudara	13
B. LESI PREMALIGNA PAYUDARA	15
1. Perubahan fibrokistik	15
Perubahan Non Proliferatif	16
Lesi Perubahan Proliferatif	17
LESI MALIGNA PAYUDARA	24



D. PATOGENESIS TUMOR PAYUDARA	27
E. KLASIFIKASI, DIAGNOSIS, PEMERIKSAAN DAN TERAPI KANKER PAYUDARA	33
1. Faktor Risiko yang Terkait	33
2. Klasifikasi Karsinoma	36
3. Diagnosis	38
4. Pemeriksaan Fisik	39
5. Pemeriksaan Penunjang	40
6. Terapi KPD	40
F. DERAJAT KEGANASAN HISTOLOGIK KPD	43
G. RESEPTOR HORMONAL KPD	48
H. PEMBAGIAN JENIS MOLEKULAR KPD	54
I. FAKTOR PROGNOSIS KPD.....	58
1) Dampak hipoksia	61
2) Lingkungan Mikro Intratumoral arsinoma Payudara.....	62
1) Hipoksia pada jenis proliferasi sel yang membentuk pola solid	66
J. HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1 (HIF-1) PADA KPD	68
K. MENCIT SEBAGAI HEWAN PERCOBAAN/PENELITIAN	71
BAB III KERANGKA TEORI.....	79
BAB IV	84
BAB V METODE PENELITIAN	85
A. RANCANGAN PENELITIAN	85
B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	85
C. POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN.....	85
D. KRITERIA INKLUSI.....	85
E. KRITERIA EKSKLUSI	86
1. MENENTUKAN JUMLAH SAMPEL	86
2. TEMPAT DAN WAKTU PERAKHIRAN SAMPEL	86
3. METODE KERJA	86



I. CARA PENELITIAN	87
a. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian, pengambilan spesimen.....	87
b. Preparasi sediaan histopatologik hematoksilin-eosin.....	91
c. Prosedur pewarnaan imunohistokimia (IHK) indeks proliferasi Ki67 (jika lesi maligna).....	96
d. Pemeriksaan Ekspresi Gen.....	99
ALUR PENELITIAN.....	107
J. IZIN PENELITIAN DAN ETHICAL CLEARANCE	108
1. Izin Penelitian	108
2. <i>Ethical Clearance</i> (Etika Penelitian)	108
K. IDENTIFIKASI VARIABEL DAN KLASIFIKASI VARIABEL PENELITIAN	109
1. Identifikasi variabel	109
2. Klasifikasi Variabel	110
L. DEFINISI OPERASIONAL DAN KRITERIA OBJEKTIF	111
1. Definisi Operasional	111
2. Kriteria Objektif	114
M. PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA	115
BAB VI	116
A. EKSPRESI MRNA GEN HIF-1 A, VEGF, DAN EKSPRESI PROTEIN KI 67 PRE/POST INDUKSI DMBA DAN/ATAU PEMBERIAN ANTI VEGF(BEVACIZUMAB)	117
B. EKSPRESI MRNA GEN HIF-1 A PADA MENCIT BALB/C SEBELUM DAN SETELAH DIINDUKSI DENGAN DMBA	118
C. EKSPRESI MRNA GEN VEGF PADA MENCIT BALB/C SEBELUM DAN SETELAH DIINDUKSI DENGAN DMBA	119
KADAR KI67 PADA MENCIT BALB/C SEBELUM DAN SETELAH INDUKSI DD MBA	120
D. HUBUNGAN EKSPRESI MRNA GEN HIF-1 MRNA GEN VEGF DAN KADAR KI67 PADA BALB/C YANG DIINDUKSI DMBA	122
EKSPRESI MRNA HIF-1 SETELAH PEMBERIAN ANTI VEGF	122



F. EKSPRESI MRNA VEGF SETELAH PEMBERIAN ANTI VEGF	124
G. KADAR Ki67 SETELAH PEMBERIAN ANTI VEGF(BEVACIZUMAB).....	125
H. HISTOPATOLOGI JARINGAN PAYUDARA MENCIT BALB/C POST-INDUKSI DMBA DAN INDEK PROLIFERATIF Ki67.	127
BEBERAPA HASIL PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI DAN EKSPRESI Ki67	128
I. PEMBAHASAN HISTOPATOLOGI DAN KAITANNYA DENGAN EKSPRESI GEN HIF-1 A, VEGF DAN KADAR Ki67.....	131
a. Pembahasan ekspresi gen HIF-1 α , VEGF dan kadar Ki67	131
b. Pembahasan ekspresi mRNA gen VEGF pada fase post induksi DMBA dan kaitannya dengan ekspresi mRNA gen HIF-1 α	135
c. Pembahasan ekspresi protein Ki67 post induksi DMBA dan hubungannya dengan mRNA HIF-1 α dan mRNA VEGF	138
J. PEMBAHASAN HISTOPATOLOGI PAYUDARA MENCIT BALB/C POST-INDUKSI DMBA/ ANTI VEGF	138
K. KETERBATASAN DALAM PENELITIAN.....	142
BAB V PENUTUP.....	143
A. KESIMPULAN	143
B. SARAN.....	144
DAFTAR PUSTAKA.....	145



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Faktor Risiko Kanker Payudara	22
Tabel 2. <i>Bloom-Richardson Grade</i> Histopatologi KPD	42
Table 3. Skor <i>Bloom Richarson Grade</i>	42
Tabel 4. Intepretasi Bloom-Richardson Grading Histopatologi KPD	43
Tabel 5. Pembagian Molekuler reseptor hormonal derajat keganasan KPD	52
Tabel 5. Ekspresi HIF-1 α , VEGF, protein Ki-67 post induksi DMBA dan Anti VEGF	114
Tabel 6. Ekspresi mRNA gen HIF-1 pada mencit Balb/c post induksi DMBA	115
Tabel 7. Ekspresi mRNA gen VEGF pada mencit Balb/c pre/post induksi DMBA	117
Tabel 8. Kadar Ki67 pada mencit Balb/c sebelum dan setelah diinduksi DMBA	118
Tabel 9. Hubungan ekspresi gen HIF-1, VEGF dan kadar Ki67 post DMBA	120
Tabel 10. Ekspresi gen HIF-1 pada kel. 1 dan 2 pre /post DMBA, dan anti VEGF	121
Tabel 1. Perbedaan ekspresi gen VEGF kel.1 dan 2 pre/post DMBA & anti VEGF	122
Tabel 22. Kadar Ki67 pada kel.1 dan 2 pre/post DMBA, & anti VEGF	123
Table 13. Histopatologi payudara Balb/c kel. 1,2,3 (induksi DMBA /Anti VEGF)	125

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Anatomi kelenjar payudara	9
Gambar 2. Lobus normal—fase luteal dari siklus menstruasi	10
Gambar 3. Perubahan fibrokistik pada jenis pada biopsy payudara	15
Gambar 4. Hiperplasia duktus, duktulus	16
Gambar 5. Sclerosing adenosis asinus terpola <i>swirling pattern</i>	17
Gambar 6. Fibroadenoma mammae	20.
Gambar 7. Histologik jenis dari well-differentiated carcinoma	43
Gambar 8. Moderately differentiated carcinoma (grade 2)	44
Gambar 9. Histologi kpd <i>high grade (grade 3)</i>	44
Gambar 10. Cara standar penilaian menurut Nothingham Richardson	46



Gambar 11: Gen terkait hif-1 α dan perannya dalam hipoksia mekanisme adaptif. hif-1 α mengatur fisiologi kanker dan gen yang terkait	63
Gambar 12. Struktur hif-1	68
Gambar 13. Skema hif-1 dan hif 1 β . saat hipoksia	68
Gambar 14. Distribusi anatomi payudara wanita(a),anjing betina (b) dan mencit	70
Gambar 15.Mikroskopik preparat pewarnaan hematoksilin eosin,mammae tikus	72
Gambar 16.Ekspresi gen HIF-1 pada kel.1 dan 2 pre/post DMBA, &anti VEGF	121
Gambar 17.Ekspresi gen VEGF kel.1 & 2 pre/post DMBA&antiVEGF	123
Gambar 18. kadar ki67 pada kel.1 dan 2 pre/post dmba & antiVEGF	124
Gambar 19.Histopatologi payudara mencit dengan FCD disertai UDH	125
Gambar 20. Histopatologi focus KSS epidermis kulit papilla & Ki67	125
Gambar 21. Histopatologi payudara mencit pd jar.adiposa	127
Gambar 22.Histopatologi payudara mencit dekat folikel limfoid	127
Gambar 23.Histologi HE dan IHK Ki-67dgn gambaran focus KSS kulit	127
Gambar 24. Histologi HE&IHK Ki67fokus KSS pd papilla mammae	128
Gambar 25. Histologi sediaan HE & IHK Ki67(kiri) dan HE (kanan) focus KSS	128
Gambar 26.Histologi sediaan HE kel DMBA yg didiagnosis UDH	129
Gambar 27.Histologi sediaan HE kel DMBA yang diagnosis FCD	129



DAFTAR SINGKATAN

KPD	: Karsinoma payudara
GLOBOCAN	: <i>Global Burden of Cancer</i> of the world
BRCA-1	: the breast cancer susceptibility gene-1
BRCA-2	: the breast cancer susceptibility gene-2
CAFs	: Carcinoma-associated fibroblasts
CA IX	: Carbonic anhydrase IX
CoCl ₂	: <i>Cobalt Clorida</i>
COX-2	: Cyclooxygenase-2
CTGF	: connective tissue growth factor
DFS	: Disease-free survival
DFX	: desferrioxamine
DMOG	: <i>Dimethyloxallyl Glycine</i>
DMBA	: Dimethyl Benzena Anthracene
ECM	: Extracellular matrix
EPO	: Erythropoietin
EPOR	: EPO receptor
ER	: estrogen reseptor
ER α	: Estrogen reseptor α
ESC	: Endometrial Stromal Cells
ER	: Estrogen reseptor
FLT1	: VEGF receptors1
FNAB	: Fine Needle Aspiration Biopsy
GPER	: The G-protein estrogen reseptor
GLUT-1	: Glucose transporter 1
HRE	: Hypoxia responsive element 1
HER2/neu	: human epidermal growth factor reseptor
HIF-1	: Hypoxia-inducible factor-1
HIF-1 α	: Hypoxia-inducible factor-1 α
HUVECs	: human umbilical vein endothelial cells
IHK	: Immunohistokimia
KGB	: kelenjar getah bening
KDR atau FLK1	: VEGF Receptors2
KSS	: Karsinoma sel skuamosa
LDHA	: <i>laktat dehidrogenase A</i>
LSD	: least significant difference
α PR	: Progesteron Reseptor A
β PR	: Progesteron Reseptor Betha
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MVD	: Microvessel density
MPI	: Nottingham Prognostic Index
	: neuropilin 1
	: Overall survival
	: Phosphatidylinositol 3-kinase
	: Progesterone reseptor



PR	: progesterone reseptor
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
SDF-1	: Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12)
TBS	: Tris-buffered saline
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
MAP3Ks	: <i>mitogen activated protein3 kinase</i>
MMPs	: <i>matriks metalloproteinase</i>
MCP-1	: <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MD-2	: <i>myeloid differentiation protein 2</i>
mRNA	: <i>masenger Ribonucleated acid</i>
mTOR	: <i>mammalian target of rapamycin</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-β</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	: <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PIP 2	: <i>phosphatidylinositol 4.5 diphosphate</i>
PIP 3	: <i>phosphatidylinositol 3, 4, 5 trifosfat</i>
PKR	: <i>dsRNA-dependent protein kinase</i>
RNA	: <i>Asam ribonukleat</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	: <i>sReverse Transcriptase-PCR</i>
SBDD	: <i>structure-based drug design</i>
SDS	: <i>Sodium Deodesil Sulfat</i>
SODD	: <i>Silencer of death domain</i>
TACE	: <i>TNFα converting enzyme</i>
TAK	: <i>TGFβ activated kinase</i>
TEG	: <i>thrombelastography</i>
TGF β	: <i>growth factor-beta</i>
TLRs	: <i>Toll like receptor</i>
TNFR	: <i>TNF receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Faktor- α</i>
TRADD	: <i>TNFR associated death domain protein</i>
TRAF	: <i>TNFR associated factor</i>
TRAPS	: <i>TNFR associated periodic syndrome</i>
UDH	: <i>Usual Ductal Hyperplasia</i>
VCAM-1	: <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGFR2	: <i>vaskular endothelial growth reseptor</i>



BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Polusi udara memiliki dampak buruk terhadap kesehatan manusia dan lingkungan terbesar di dunia. Salah satu sumber polutan lingkungan utama berbahaya bagi manusia berasal dari golongan poliaromatik hidrokarbon (PAH) yang umumnya mudah ditemukan di sekitar lingkungan daerah perkotaan. Polutan utama lingkungan ini banyak berasal dari asap sisa kendaraan bermotor, asam rokok, asap pembakaran pabrik-pabrik dan lain-lain. Dampak buruk polutan asap dari golongan PAH ini dapat menimbulkan reaksi stress oksidasi terhadap sel tubuh manusia yang akan memberikan efek berikutnya di dalam sel/jaringan, mulai dari reaksi timbulnya peradangan kronik, reaksi alergi sampai berhubungan dengan proses terjadinya proliferasi sel tidak terkendali yang merupakan prinsip dasar terjadinya tumorigenesis atau karsinogenesis. (Leni, Künzi and Geiser, 2020) Salah satu zat karsinogen dari polutan lingkungan utama yang berasal dari golongan PAH ini dan berhubungan dengan factor risiko kanker adalah zat karsinogen *7,12-dimethylbenz(a)-antrasena* (DMBA). (Buculei *et al.*, 2022) Penelitian-penelitian yang menggunakan zat karsinogen DMBA ini sering dipakai untuk induksi karsinogenesis pada hewan model. DMBA merupakan zat karsinogen lingkungan yang dapat menginduksi beberapa kanker yaitu kanker hati, kanker payudara, kanker paru-paru, mulut, dan kulit. Zat karsinogen ini merupakan



golongan dari senyawa hidrokarbon poliaromatik (PAH), yang memiliki sifat yang mirip dengan estrogen. Senyawa DMBA ini bisa menjadi metabolit aktif setelah dimetabolisme oleh sitokrom P-450 dan akan mengikat DNA secara kovalen untuk membentuk *DNA adduct* yang dapat memicu pembentukan tumor ganas (Wibowo et al., 2010).

Efek DMBA diawali oleh proses reduksi enzimatik dari kelompok nitro yang akan menghasilkan spesies radikal bebas (ROS) berlebihan sehingga mengakibatkan stress oksidatif dan disfungsi seluler yang akan mengakibatkan proses fase inisiasi sel menjadi sel tumor (Barros et al., 2004; Wibowo et al., 2010). Stress oksidatif dipengaruhi oleh ketidakseimbangan antara antioksidan dan produksi radikal bebas seperti anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^-) yang menyebabkan kerusakan oksidatif dan cedera jaringan (Rajakumar et al., 2018). Penelitian menunjukkan bahwa ROS yang berlebihan berkaitan erat dengan gangguan fungsi makromolekul seluler seperti lipid, protein, dan DNA; yang selanjutnya dapat mengubah sifat membran intrinsik seperti fluiditas, transportasi ion, hilangnya aktivitas enzim, penghambatan sintesis protein dan pembentukan DNA adduct yang mendorong mutagenesis dan transformasi ganas (Kwon et al., 2016; Mani et al., 2018; Wibowo et al., 2010).



DNA adduct yang terbentuk akan memicu proliferasi sel melalui peningkatan CYP1B1 akibat induksi DMBA. CYP1B1 adalah suatu enzim hidroksilase E2 yang utama dimana terlibat dalam reaksi metabolisme zat potensial. Ekspresi CYP1B1 dilaporkan lebih tinggi pada tumor dibandingkan jaringan normal, terutama pada kanker terkait hormon termasuk tumor payudara, ovarium, dan prostat. atau vektor ekspresi berlebih, selain penurunan CYP1B1 melalui inhibitor tetramethoxystilbene (TMS) atau knockdown siRNA. Peran CYP1B1 tampak mendorong proliferasi, migrasi, dan invasi sel. (Buculei *et al.*, 2022)

Proliferasi sel yang tumbuh tidak terkendali secara terus menerus akan membentuk massa tumor yang timbul di permukaan tubuh ataupun tumbuh dalam tubuh. Proses proliferasi sel tidak terkontrol ini umumnya dimulai melalui tahap inisiasi dan promosi sel normal. Proses proliferasi ini dipengaruhi pengaruh berbagai faktor risiko yang bersifat endogen maupun eksogen. Faktor eksogen yang paling sering memberikan paparan epigenetic terhadap proses tumorigenesis ini berasal dari zat polutan lingkungan dan diet. Zat polutan lingkungan banyak berasal dari sisa pembakaran, asap rokok, asap mesin kendaraan atau asap pabrik. Zat polutan ini menimbulkan mutasi sel pada tahap inisiasi dan tahap promosi yang selanjutnya memicu proliferasi sel abnormal. Proliferasi sel yang tidak terkendali dapat bersifat premalignansi atau berubah menjadi malignan.



Pertumbuhan sel premalignansi bisa bersifat neoplasma jinak atau hanya proses perbanyakkan komponen sel yang bersifat normal, baik dalam fungsi dan struktur selnya. Jika terjadi proliferasi sel atipik yang berbeda dengan bentuk struktur sel normal, maka bersifat lebih agresif karena yang mengalami proliferasi adalah sel yang telah mutasi, yang bersifat lebih agresif, destruktif dan dapat menyebabkan anak sebar yang jauh.

Pertumbuhan sel tumor atipik yang bersifat sangat agresif ini akan menyebar ke organ terdekat ataupun jauh, bisa menyebar melalui pembuluh darah dan aliran getah bening. Pada sel tumor yang memiliki kecepatan proliferasi sel sangat tinggi akan menimbulkan soliditas massa tumor yang cepat dan sangat berpotensi menimbulkan kondisi hipoksia yang semakin berat. Keadaan hipoksia jaringan tumor dan lesi proliferative yang cepat merupakan gambaran utama pada jenis tumor solid. Penelitian melaporkan bahwa kondisi hipoksia berperan utama dalam menciptakan lingkungan sel intratumoral tumor untuk berproliferasi lebih cepat dan cepat bermetastase. (Muz *et al.*, 2015)(Sletta *et al.*, 2017).

Pada prinsipnya, kondisi hipoksia sel/ jaringan dapat menyebabkan peningkatan factor transkripsi yang disebut protein *mRNA gen HIF-1 α* . Factor transkripsi ini merupakan regulator utama

banyak factor transkripsi lain sebagai respon adaptasi sel
m menjaga kelangsungan hidup sel (homeostasis). Pada saat



sel mengalami hipoksia, HIF-1 bertindak sebagai faktor transkripsi yang terlibat dengan banyak mekanisme adaptasi sel.

Factor transkripsi HIF-1 α yang diekspresikan berlebihan akan menyebabkan gangguan banyak fungsi seluler esensial, sehingga mengakibatkan sel tumor menjadi lebih agresif dan menimbulkan resistensi khasiat kemoterapi yang tidak memuaskan (Badowska-Kozakiewicz et al., 2015) (Rani et al., 2022a)(Zou et al., 2017) (Cui et al., 2016; Semenza, 2016; Singh et al., 2017)

Hipoksia pada sel tumor lebih sering terjadi pada area yang lebih perifer dimana area ini akan mendapatkan pasokan aliran darah yang lebih sedikit sehingga terjadi hipoksia atau terjadi pasca terapi-diinduksi karena massa tumor yang memiliki tingkat perfusi rendah sangat rentan terhadap hipoksia anemia. Jaringan normal dapat mengimbangi iskemia dengan meningkatkan jumlah oksigen yang diambil dari darah dan dapat mencegah anemia dengan mempercepat laju aliran darah lokal. Namun, tumor tidak mampu mengatur kadar oksigen yang semakin berkurang, yang mengarah ke perkembangan hipoksia (Hayashi et al., 2019; Y. Te Lin & Wu, 2020).(Hayashi et al., 2019)(Lin and Wu, 2020)

Pengaktifan HIF-1 α sebagai regulator utama bagi gen-gen lain sangat berperan dengan berbagai ekspresi gen yang terkait dengan angiogenesis, regulasi metabolisme, keseimbangan pH dan

osis sel, yang meningkatkan kelangsungan hidup tumor (Semenza, 2016); Corrado & Fontana, 2020). Salah satu jalur penting



yang dimediasi oleh HIF-1 untuk kelangsungan hidup sel tumor yang mempromosi proses angiogenesis yang berperan dalam proses progresi perkembangan tumor dan reperfusi pasca-iskemia yang didahului oleh pelepasan VEGF intraseluler yang dimediasi oleh HIF-1 α dan juga terjadi secara langsung dan simultan terhadap pelepasan VEGF oleh kondisi stress hipoksia.(Tsuzuki *et al.*, 2012). Ekspresi VEGF juga dapat diproduksi oleh sel-sel endothelial yang melapisi pembuluh darah selain faktor transkripsi lain.(Comunanza and Bussolino, 2017)(Pradeep, Sunila and Kuttan, 2005) (Rajabi et all, 2017) (Hadi et al., 2017).

Gambaran proses proliferasi sel secara molekular juga diekspresikan oleh meningkatnya kadar protein Ki67. Ekspresi protein ini berperan di dalam fase aktif siklus sel baik siklus G1, S, G2 dan mitosis. Serangkaian proses itu terjadi selama proses proliferasi dalam peristiwa siklus sel yang terus-menerus dan tidak terkendali. (Triner and Shah, 2016)

Penggunaan Ki-67 sebagai penanda prediktif dan prognostik pada kanker payudara telah banyak diteliti. Data terbaru menunjukkan bahwa ekspresi Ki-67 di atas 10% -14% sel positif kanker mengindikasikan kelompok berisiko tinggi, atau prognosisnya buruk. Oleh karena itu protein ini digunakan sebagai penanda atau marker untuk proliferasi berbagai sel tumor, alat diagnosis dan indikator

osik dalam terapi kanker (Zhu et al., 2020).

Oleh karena itu, model proses karsinogenesis melalui proses



induksi DMBA pada mencit dianggap sebagai salah satu model untuk mempelajari karsinogenesis payudara pada tikus/ mencit yang meniru morfologi dan histologi manusia. Berdasarkan latar belakang diatas maka dilakukan penelitian ini mengenai hubungan ekspresi mRNA Gen HIF-1, mRNA Gen VEGF, ekspresi Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA dan hubungannya dengan gambaran histopatologi jaringan payudara.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah DMBA dapat menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang tidak terkontrol pada mencit Balb/ c ?
2. Apakah pada mencit Balb/c yang diinduksi DMBA dapat terjadi hipoksia sel-sel tumor yang menyebabkan peningkatan ekspresi gen mRNA HIF-1, dan ekspresi mRNA gen VEGF?
3. Apakah peningkatan HIF-1 akan meningkatkan proses angiogenesis pada jaringan proliferaatif/ tumor yang ditandai dengan peningkatan kadar mRNA gen VEGF?
4. Apakah peningkatan mRNA gen HIF-1 dan mRNA gen VEGF dapat menyebabkan proliferasi sel-sel epitelial payudara yang ditandai oleh peningkatan kadar protein Ki67?
5. Apakah pemberian AntiVEGF dapat menyebabkan penurunan angiogenesis pada sel/ jaringan dan penurunan proliferasi sel/jaringan yang ditandai oleh penurunan kadar ekspresi protein

67?



C. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah.

1. Induksi DMBA dapat meningkatkan ekspresi mRNA gen HIF-1 pada mencit Balb/c.
2. Induksi DMBA dapat meningkatkan ekspresi mRNA gen VEGF pada mencit Balb/c.
3. Induksi DMBA dapat meningkatkan proliferasi sel-sel jaringan payudara pada mencit Balb/c.
4. Induksi DMBA dapat meningkatkan kadar Ki67 pada mencit Balb/c.
5. Terdapat hubungan ekspresi mRNA gen HIF-1, mRNA gen VEGF dan kadar Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi DMBA.
6. Pemberian antiVEGF mengakibatkan penurunan kadar HIF-1, VEGF dan kadar protein Ki67 yang mencerminkan penurunan proliferasi sel dan proses angiogenesis pada jaringan payudara mencit.

D. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum

Mengetahui ekspresi mRNA gen HIF-1, mRNA gen VEGF, kadar protein Ki67 disertai gambaran histopatologik jaringan payudara mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA dan anti VEGF.

2. Tujuan khusus

- a. Mengetahui peningkatan ekspresi mRNA gen HIF-1 pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA.



- b. Mengetahui peningkatan ekspresi mRNA gen VEGF pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA.
- c. Mengetahui peningkatan proliferasi sel jaringan payudara pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA.
- d. Mengetahui peningkatan ekspresi Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA.
- e. Mengetahui hubungan ekspresi mRNA gen HIF-1 , mRNA gen VEGF dan ekspresi Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi DMBA.
- f. Mengetahui penurunan ekspresi mRNA gen HIF-1 , VEGF, ekspresi Ki67 dan proliferasi sel jaringan payudara pada mencit Balb/c setelah pemberian anti VEGF.

E. Manfaat Penelitian

1. Kegunaan Ilmiah

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang ekspresi mRNA gen HIF-1, mRNA gen VEGF, ekspresi Ki67 dan gambaran histopatologi jaringan payudara pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan DMBA dan anti VEGF.

2. Kegunaan Praktis

- a. Hasil penelitian ini diharapkan HIF-1, VEGF, imunoekspresi Ki67 pada mencit Balb/c dapat digunakan sebagai biomarker dan terapi antikanker KPD.

- b. Penelitian pada hewan mencit Balb/c diharapkan dapat menjadi langkah awal yang berkelanjutan untuk dikembangkan di



Institusi pendidikan kedokteran dalam rangka memajukan bidang penelitian patologi eksperimental.

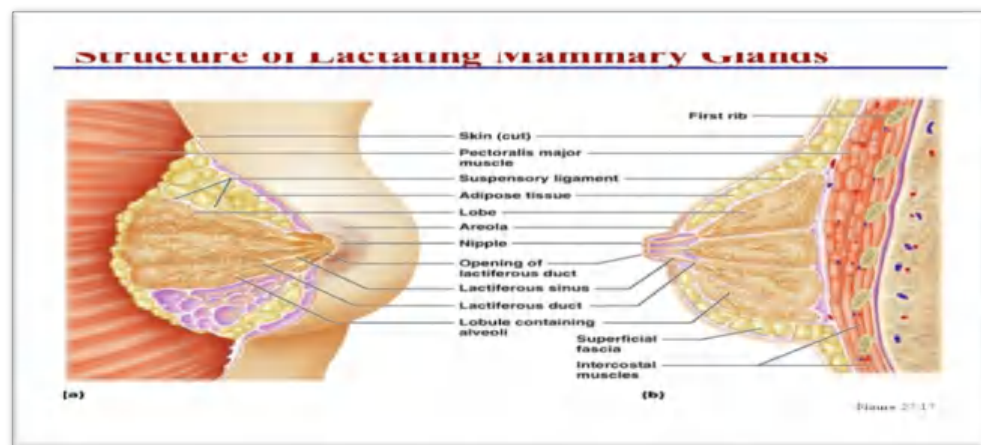


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Anatomi, Histologi Dan Fisiologi Payudara

1. Anatomi Payudara

Payudara dewasa terletak di atas otot pektoralis mayor dan memanjang ke aksila sebagai ekor dari *Spence* yang berbatas fascia pektoralis. Bagian luar payudara meluas ke arah otot serratus anterior dari sisi lateral, kemudian pada bagian inferior di atas otot oblikus eksternal dan superior selubung rektus, dan medial ke tulang dada (anatomi perifer payudara tidak didefinisikan secara tepat, kecuali pada permukaan dalam Barber, 2008; Hoda, 2014a).



Gambar 1. Anatomi kelenjar payudara

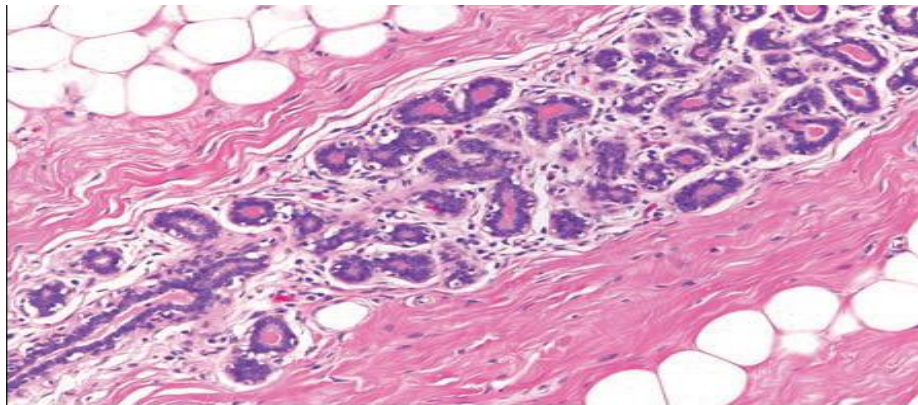
Sumber : <https://www.anatomynote.com/human-anatomy/breast-anatomy/structure-of-lactating-mammary-glands-diagram>

2. Histologi Payudara

Secara histologik payudara dewasa matur terdiri dari 15 - 25 lobulus disertai stroma parenkimnya. Masing-masing lobulus berhubungan dengan puting melalui duktus laktiferus utama yang



merupakan duktus memanjang yang dilapisi epitel yang dipengaruhi hormon estrogen, hormone *growth hormone* dan *glucocorticoid hormone*,dimana secara fisiologis hormone mempengaruhi epitel duktal, asinus dan stroma sehingga membentuk benjolan ke depan (Barber, 2008; Mills et al., 2016). Diferensiasi duktus terminal dan lobus-lobus dipengaruhi oleh hormon insulin, progesterone dan *growth hormone*. Lobulus-lobulus berasal sekumpulan sel-sel yang terbentuk di ujung duktus terminal. Secara anatomi payudara dibagi atas tiga bagian yaitu korpus, areola dan puting.



Gambar 2. Lobus normal—fase luteal dari siklus menstruasi

Korpus mammae mengandung alveolus (penghasil ASI), lobulus, dan lobus. Areola merupakan area sekitar puting yang berwarna coklat kehitaman dan pada permukaan area mengandung kelenjar sebacea Montgomery.((Hoda, 2015)

Struktur histologi kelenjar payudara bervariasi sesuai dengan jenis, usia dan status fisiologis. Setiap kelenjar payudara terdiri dari 5-25 lobus yang tersusun radier di sekitar puting, yang berfungsi menyekresi air susu bagi neonatus. Setiap lobus, dipisahkan oleh



jaringan ikat dan jaringan lemak, yang merupakan kelenjar ductus ekskretorius lactiferus. Ductus ini bermuara ke papilla mammae. Jaringan ikat akan memadat membentuk pita fibrosa yang tegak lurus terhadap substansi lemak. Pita ini mengikat lapisan dalam dari fascia subkutan payudara pada kulit. Pita jaringan ikat ini disebut dengan *Ligamentum Cooper* atau *Ligamentum Suspensorium* payudara. Setiap lobus berbeda– beda, sehingga penyakit yang menyerang satu lobus tidak menyerang lobus lainnya (Hoda et al., 2014; Junqueira & Carneiro, 2013).

Sebelum pubertas, kelenjar payudara terdiri atas sinus laktiferus dan beberapa duktus laktiferus. Struktur khas kelenjar dan lobus pada wanita dewasa berkembang pada ujung duktus terkecil. Sebuah lobus terdiri atas sejumlah duktus yang bermuara ke dalam satu duktus terminal dan terdapat dalam jaringan ikat longgar. Duktus laktiferus menjadi lebar dan membentuk sinus laktiferus di dekat papilla mammae. Lapisan duktus laktiferus dan duktus terminal merupakan epitel selapis kuboid dan dibungkus sel mioepitel yang berhimpitan (Ferreira et al., 2021; Junqueira & Carneiro, 2013).

3. Fisiologi Payudara

Puting (papilla mammaria) merupakan bagian menonjol dan berpigmen di puncak payudara dan tempat keluar ASI. Papilla

mammae mempunyai lubang pada bagian ujung terdiri dari beberapa bang kecil, yang disebut *apertura duktus laktiferosa*. Suplai arteri



ke payudara berasal dari arteri *mammaria interna*, yang berasal dari cabang arteri *subklavia*. Suplai arteri tambahan lainnya berasal dari cabang arteri aksilari toraks. Aliran darah balik payudara dialirkan melalui vena profunda dan vena superfisial yang menuju vena kava superior sedangkan aliran limfatik dari bagian sentral kelenjar mammae, kulit, puting, dan aerola adalah melalui bagian tepi/ lateral menuju aksila. Dengan demikian, aliran limfe dari payudara mengalir melalui nodus limfe (kelenjar getah bening) di regio aksilaris. (Kluwer and Reserved, 2015)(Hoda, 2015)

Maturasi yang lengkap dari kelenjar payudara terjadi pada perempuan saat menarke; sedangkan pada bayi, anak-anak, dan laki-laki, kelenjar ini hanya berbentuk rudimenter. Fungsi utama payudara wanita adalah mensekresi air susu untuk nutrisi bayi. Fungsi ini diperantarai oleh hormon estrogen dan progesterone. Payudara wanita mengalami tiga tahap perubahan perkembangan yang dipengaruhi oleh hormon. Perubahan pertama terjadi sejak masa pubertas, dimana estrogen dan progesteron menyebabkan berkembangnya duktus dan timbulnya asinus. Selain itu yang menyebabkan pembesaran payudara terutama karena bertambahnya jaringan kelenjar dan deposit lemak. Perubahan kedua sesuai dengan siklus menstruasi, yaitu selama menstruasi terjadi pembesaran vaskular, dan pembesaran kelenjar sehingga menyebabkan payudara mengalami pembesaran maksimal, tegang,



dan nyeri saat menstruasi. Perubahan ketiga terjadi saat kehamilan dan menyusui.

Payudara akan membesar akibat proliferasi dari epitel duktus lobul dan duktus alveolus, sehingga tumbuh duktus baru. Selama kehamilan tua dan setelah melahirkan, payudara menyekresikan kolostrum karena adanya sekresi hormon prolaktin dimana alveolus menghasilkan ASI, dan disalurkan ke sinus kemudian melalui duktus ke puting susu. Setelah menyapih, kelenjar lambat laun beregresi dengan hilangnya jaringan kelenjar. Pada saat menopause, jaringan lemak beregresi lebih lambat bila dibandingkan dengan jaringan kelenjar, namun akhirnya akan menghilang meninggalkan payudara yang kecil dan menggantung (Hoda, 2014a; Hughes, 2021).

B. Lesi Premaligna Payudara(Kumar *et al.*, 2015)

1. Perubahan fibrokistik

Sebutan *fibrocystic change* diterapkan untuk berbagai kelainan pada payudara terdiri dari pembentukan kista dan fibrosis. Pada masa lalu, kelainan ini disebut *penyakit fibrokistik*, tetapi karena kelainan ini mempunyai makna klinis terbatas, kecuali untuk membedakannya dengan kanker, istilah yang lebih tepat disebut perubahan *fibrokistik*. Secara keseluruhan, perubahan fibrokistik merupakan kelainan abnormal payudara yang paling sering dijumpai pada wanita premenopause. Perubahan ini lebih sering timbul selama usia reproduktif dan merupakan akibat *perubahan siklik*



payudara yang terjadi secara normal pada siklus haid. Perubahan fibrokistik dapat dibagi menjadi pola nonproliferatif dan proliferasif, seperti akan diuraikan selanjutnya.

2. Perubahan Non Proliferasif

Kista dan Fibrosis

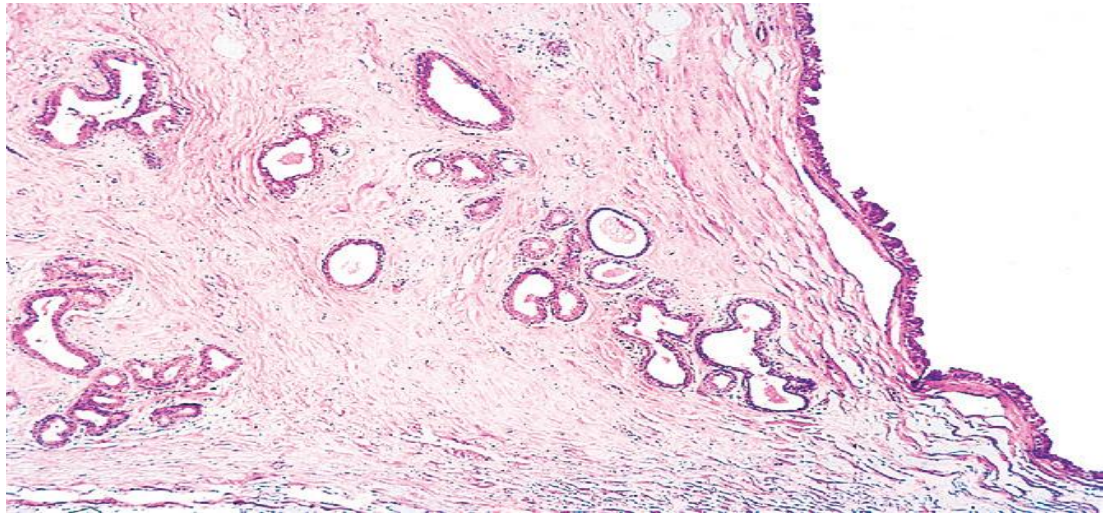
Perubahan nonproliferasif merupakan perubahan fibrokistik yang paling sering ditemukan, yang ditandai oleh penambahan stroma jaringan ikat fibrosa yang berhubungan dengan pelebaran duktus dan pembentukan kista dalam berbagai ukuran.

Morfologi *fibrocystic change*

Gambaran mikroskopik rongga kista bisa tunggal dan besar pada satu payudara, tetapi lesi ini biasanya bersifat multifokal dan sering terjadi bilateral. Daerah yang terjangkiti berbatas tidak tegas, densitas meningkat dan nodul yang timbul lebih jelas pada pemeriksaan mamografi. Diameter kista berukuran berkisar < 1 cm sampai 5 cm. Sekret di dalam kista dapat mengalami perkapuran, sehingga memberikan gambaran mikrokalsifikasi pada mamogram. Permukaan dalam kista dapat berlapis selapis epitel kolumnar/kuboid atau epitel gepeng sampai atropik pada kista yang lebih besar. Sebagian epitel yang melapisi kista mengalami metaplasia apokrin. Stroma yang mengelilingi semua jenis kista terdiri dari jaringan fibrosa yang padat. Infiltrat limfosit pada stroma



lazim ditemukan, demikian juga pada semua varian kelainan fibrokistik.



Gambar 3. Perubahan fibrokistik pada jenis biopsi payudara. Tampak sediaan ini duktus yang melebar membentuk mikrokista dan di kanan, dinding dari kista yang besar dilapisi oleh sel epitel. (sumber : Dr. Kyle Molberg, Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, Texas)

3. Lesi Perubahan Proliferatif

1) *Hiperplasia Epitel*

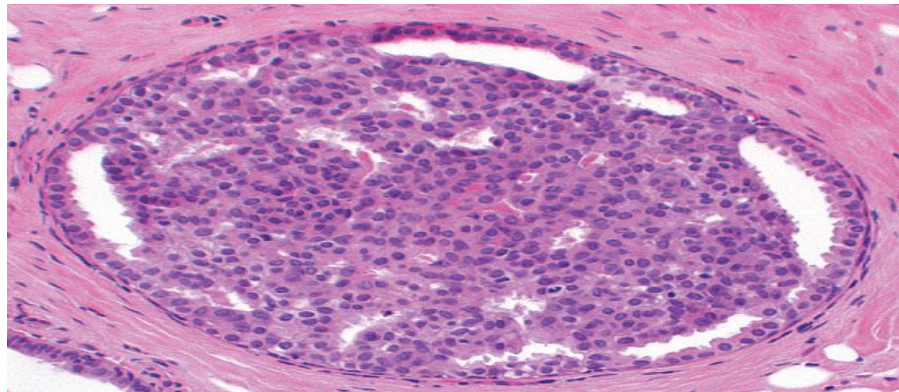
Duktus dan lobulus normal payudara dilapisi oleh dua lapis sel epitel yaitu selapis epitel kolumnar disertai sel mioepitel. *Hiperplasia* epitel dikenal dengan adanya lebih dari dua lapis sel. Spektrum hiperplasia epitel mulai dari hiperplasia ringan dan teratur hingga hiperplasia atipik dengan perangai mirip karsinoma *in situ*.

Morfologi

Gambaran makroskopik hiperplasia epitel tidak dapat dibedakan, dan didominasi oleh perubahan kistik dan fibrotik yang terjadi



bersamaan. Pemeriksaan histologis menunjukkan spektrum yang hampir tidak terbatas dari perubahan proliferaatif.



Gambar 4. Hiperplasia Duktus, duktulus, lobus berlapiskan sel epitel kubik yang regular.

Derajat hiperplasia ditentukan oleh jumlah lapisan pada epitel intraduktal, mungkin ringan, sedang, atau berat. Kadang-kadang hiperplasia memberikan gambaran mikrokalsifikasi pada mamografi, sehingga menimbulkan dugaan kanker.

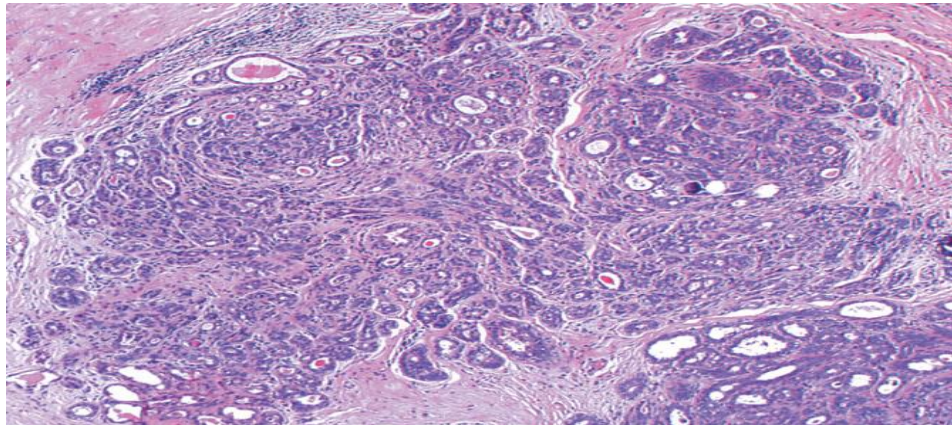
Pada beberapa keadaan sel hiperplastik mempunyai perangai mirip karsinoma duktal *in situ*. Hiperplasia semacam itu disebut hiperplasia duktus atipik. Hiperplasia lobulus atipik dipergunakan untuk menggambarkan hiperplasia yang menunjukkan perubahan yang mendekati namun belum memenuhi kriteria karsinoma lobuler *in situ*. Kedua kelainan hiperplasia duktus dan lobulus berhubungan dengan peningkatan risiko terhadap karsinoma invasif.

2) Adenosis Sklerotik/Sclerosing Adenosis

Perubahan fibrokistik yang disebut adenosis yang mengeras/sclerosing *adenosis* lebih jarang dijumpai daripada kista dan



hiperplasia, tetapi merupakan kelainan yang penting karena perangnya klinis dan morfologinya mirip karsinoma. Lesi ini menunjukkan fibrosis keras intralobuler dan proliferasi duktus kecil dan asini.



Gambar 5. Sclerosing adenosis, dimana asinus tersusun menyerupai pola "putaran-putaran" ("swirling") dan bagian luar berbatas jelas.

Makroskopik schlerosing adenosis:

lesi keras, konsistensi kenyal seperti karet, mirip kanker payudara. Pemeriksaan histologis menunjukkan gambaran karakteristik **proliferasi rongga luminal (adenosis) dilapisi sel epitel dan mioepitel**, sehingga terbentuk massa kelenjar kecil di dalam stroma fibrosa. Agregat kelenjar tersusun "back to back", dengan satu sel atau multipel yang berdekatan satu dengan lainnya. Fibrosis stroma yang mencolok.

Hubungan *Fibrocystic Change* dan kanker payudara

beberapa perangsang klinis dari perubahan fibrokistik cenderung dapat membedakan kelainan tersebut dari kanker, tetapi cara pasti adalah



dengan biopsi dan pemeriksaan histologis. Walaupun perubahan fibrokistik bersifat jinak, beberapa perangai mungkin mendukung peningkatan risiko untuk perkembangan kanker:

- a. *Risiko minimal atau tidak meningkatkan risiko terhadap kanker payudara*: fibrosis, perubahan kistik, metaplasia apokrin, hiperplasia ringan
- b. *Risiko yang agak meningkat (1,5 - 2 kali)*: hiperplasia sedang hingga berat (tanpa atipia), papilomatosis duktal, adenosis sklerotik
- c. *Risiko yang meningkat secara bermakna (5 kali)*: hiperplasia atipik, baik pada duktus atau lobus

Perubahan fibrokistik proliferasif biasanya terjadi bilateral dan multifokal dan berhubungan dengan peningkatan risiko karsinoma yang kemudian berkembang pada kedua payudara.

3) Tumor payudara

Tumor merupakan lesi terpenting pada payudara wanita. Walaupun mungkin berasal dari jaringan ikat atau struktur epitel, yang umumnya berasal dari sel yang berkembang menjadi neoplasma.

4) Fibroadenoma

Fibroadenoma merupakan neoplasma jinak payudara wanita paling sering ditemukan. Kelainan tumor bifasik ini tersusun dari

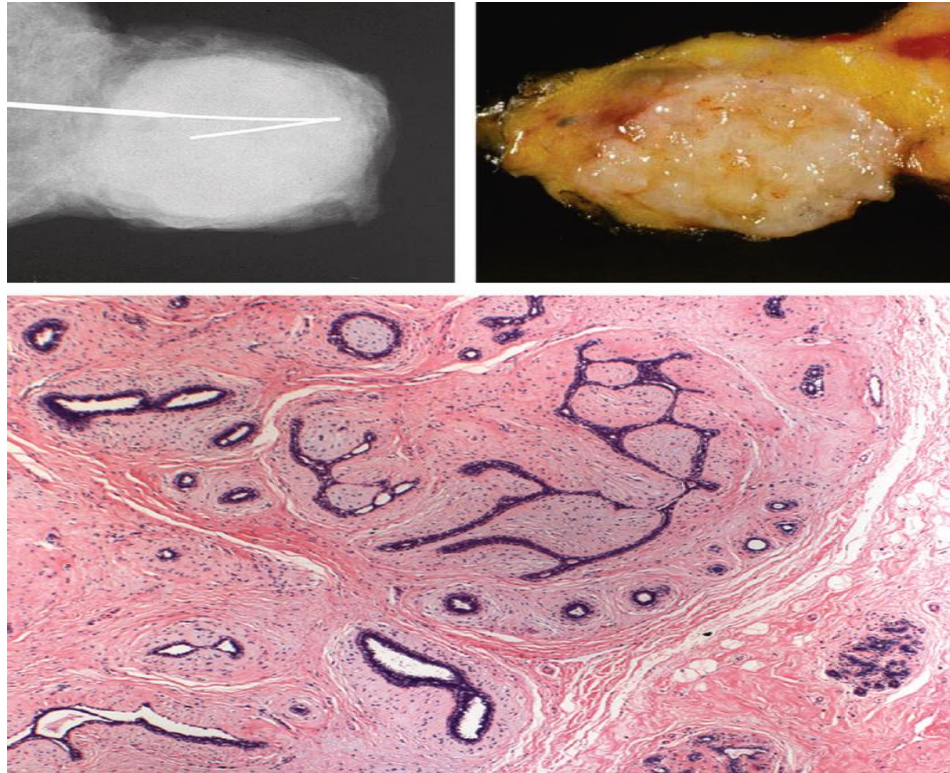


stroma fibroplastik dan kelenjar yang dilapisi epitel yang hiperplastik. Fibroadenoma banyak ditemukan pada wanita usia muda dengan puncak insidens pada dekade ketiga. Lesi umumnya soliter, berbatas tegas, dan dapat digerakkan (*mobile*). Peningkatan absolut atau relatif hormon estrogen berperan penting pada tumor jenis fibroadenoma. Jenis tumor ini mungkin membesar pada masa akhir siklus haid, dan selama kehamilan, setelah menopause, dan bisa mengalami regresi dan kalsifikasi.

Morfologi

Fibroadenoma merupakan massa tumor berbatas tegas (discrete), berdiameter 1-10 cm dengan konsistensi padat. Penampang massa tumor umumnya menunjukkan warna putih-kecoklatan, bisa disertai bercak-bercak kecil berwarna merah muda-kuning yang mewakili daerah kelenjar. Secara mikroskopik fibroadenoma tersusun atas proliferasi asinus/duktus yang dilapisi epitel kolumnar dan mioepitel dengan membran basal yang utuh disertai hiperplasia stroma fibroblastik. Sebagian duktus/asinus bisa berdilatasi yang membentuk rongga-rongga dalam berbagai bentuk dan ukuran.





Gambar 6. Fibroadenoma. **A,** Gambaran radiologik menunjukkan massa karakteristik berbatas tegas. **B,** Pada sediaan makroskopik ini, suatu massa seperti karet kenyal berbatas tegas jelas dipisahkan dari jaringan lemak disekitarnya. **C,** Pada gambaran mikroskopik terlihat proliferasi dari stroma intralobular yang menekan kelenjar yang terperangkap, menciptakan suatu "pushing" border yang secara tajam dipisahkan dari jaringan normal disekitarnya.

5) Tumor Filodes

Tumor filodes juga bersifat bifasik, yang tersusun dari sel stroma neoplastik dan kelenjar yang dilapisi epitel. Namun, unsur stroma tumor ini lebih dominan dengan selularitas yang bervariasi. Massa tumor ini sering membentuk struktur menjulur mirip daun karena kata-kata filodes itu berasal dari susunan kata *phylloides* yang berasal dari bahasa *Latin* yang berarti "mirip daun") yang dilapisi epitel. Tumor ini lebih jarang dijumpai daripada fibroadenoma dan timbul de novo. Pada masa lalu, nama filodes disebut juga *cytostarcoma phylloides* walaupun tumor ini biasanya bersifat jinak.



Perubahan filodes menjadi ganas ditandai dengan peningkatan selularitas stroma, anaplasia inti sel stromal, jumlah mitosis tinggi, ukuran tumor cepat meningkat, dan bagian tepi yang infiltratif. Namun, umumnya tumor filodes ini tetap terbatas setempat sehingga biasanya dilakukan terapi operatif dengan tindakan eksisi. Kekambuhan jenis filodes ini bisa selanjutnya menjadi lesi ganas, tetapi juga tetap memiliki batas tegas. Hanya 15% dari semua kasus benar-benar malignant infiltrative dan dapat bermetastasis ke tempat jauh.

6) Papiloma Intraduktal

Papiloma intraduktus merupakan pertumbuhan neoplastik papiler jinak, bersifat soliter dan ditemukan di dalam duktus laktiferus utama atau sinus. Paling sering dijumpai pada wanita premenopause dengan gejala klinis yang meliputi:

- Pengeluaran cairan puting susu serosum atau bercampur darah
- Terdapatnya *tumor subareolar* berdiameter beberapa milimeter
- *Retraksi puting susu*, yang jarang dijumpai

Morfologi papilloma intraduktal;

- Tumor umumnya soliter, berdiameter kurang dari 1 cm,
- terdiri dari pertumbuhan papil-papil di dalam duktus yang berdilatasi.
- Secara mikroskopik tersusun dari papil multipel, dengan permukaan berlapis epitel selapis kolumnar dan mioepitel.



C. Lesi Maligna Payudara

Berdasarkan data Globocan (2020) melaporkan bahwa kanker payudara sebagai jenis kanker terbanyak dunia sehingga tumor payudara harus mendapatkan perhatian yang utama. (Ferlay *et al.*, 2021). Decade sebelumnya, tahun 2010, dilaporkan insidennya lebih dari 200.000 jenis yang invasif di Amerika Serikat, dimana sekitar 40.000 penderita nya meninggal dunia.

Tabel 1. Faktor Risiko Kanker Payudara

Faktor yang tidak dapat dimodifikasi (pasti)	Factor Risiko Relatif
Geografi	Bervariasi pada daerah yang berbeda
Usia	Meningkat setelah usia 30
Riwayat Keluarga <ul style="list-style-type: none"> - Kanker payudara pd keluarga tingkat I - Premenopause - Premenopause dan Bilateral - Postmenopause 	1.2–3.0 3.1 8.5–9.0 1.5
Riwayat haid <ul style="list-style-type: none"> Usia menarse < 12 tahun Usia menopause >55 tahu 	1.3 1.5–2.0
Kehamilan <ul style="list-style-type: none"> Kelahiran hidup pertama dari usia 25 sampai 29 tahun Kelahiran hidup pertama setelah usia 30 tahun Kelahiran hidup pertama setelah usia 35 tahun Nulipara 	1.5 1.9 2.0–3.0 3.0
Penyakit payudara jinak <ul style="list-style-type: none"> Penyakit proliferasif tanpa atipia Penyakit proliferasif dengan hiperplasia atipik Karsinoma lobuler <i>in situ</i> 6.9–12.0 	1.6 >2.0 6.9–12.0
Faktor lain yang mungkin	
<ul style="list-style-type: none"> Estrogen eksogen Kontrasepsi oral Obesitas Diet lemak tinggi Konsumsi alkohol Merokok 	

Data dari Bilimoria MM, Morrow M: The women at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. CA Cancer J Clin 46:263, 1995



Sejumlah besar faktor risiko terdiri atas dua kelompok factor resiko, yaitu yang tidak dapat dimodifikasi (pasti) dan kelompok yang dapat dimodifikasi (relative). Faktor risiko itu antara lain.

1. **Umur.** Risiko meningkat dengan mantap sepanjang kehidupan, khususnya setelah menopause, yang memuncak pada usia 80 tahun;75% dari wanita dengan kanker payudara usianya lebih dari 50 tahun, dan hanya 5% usianya di bawah 40 tahun.
2. **Variasi Geografik.** Perbedaan geografik Negara tampak mencolok pada insiden kanker payudara yang lebih tinggi di Amerika Utara dan Eropa bagian Utara daripada di Asia dan Afrika. Insidens dan mortalitas kanker ini di Amerika lima kali lebih tinggi daripada di Jepang. Faktor resiko lingkungan agak lebih berperan daripada factor resiko genetic pada kasus perbedaan insiden atau mortalitas ini, karena emigran dari daerah dengan risiko rendah ke daerah risiko tinggi menunjukkan insidens seperti negara tempat tinggalnya yang baru, dan atau sebaliknya (timbang balik). Diperkirakan factor lingkungan ini sangat erat hubungannya dengan pola diet, pola reproduksi, dan kebiasaan menyusui.
3. **Ras/Etnik.** Risiko tertinggi untuk kanker payudara adalah pada wanita kulit putih bukan Hispanik. Namun insiden yang terjadi pada wanita Amerika Hispanik, dan keturunan



Afrika memiliki kecenderungan terjadinya kanker jenis ini pada usia lebih muda dan tingkat agresifitas lebih tinggi pada stadium lanjut. Factor pengaruh ras/etnik ini diperkirakan merupakan perpaduan antara perbedaan genetik dan faktor sosial, seperti pemilihan gaya hidup dan akses terhadap pelayanan kesehatan.

4. **Faktor risiko lain.** Paparan berkepanjangan dari hormone estrogen eksogen selama paska menopause, seperti yang terjadi pada terapi sulih hormon yang sering digunakan untuk mencegah osteoporosis golongan lansia. Bahkan menurut penelitian terakhir, pemakaian jangka pendek terapi kombinasi estrogen dan progestin berhubungan dengan peningkatan risiko insiden kanker payudara, yang terdiagnosis berada dalam stadium lanjut, dan insidens hasil mamogram yang abnormal. Laporan *Women's Health Initiative* (2002) menyatakan bahwa pemakaian kombinasi estrogen ditambah progestin mengakibatkan lebih banyak kerugian bila dibanding manfaatnya, sehingga saat ini terjadi penurunan tajam pemakaian terapi sulih hormon estrogen dan progestin disertai dengan reevaluasi mendalam terhadap terapi hormon perimenopausal.

5. **Kontrasepsi oral** tidak memiliki resiko yang bermakna terhadap kanker payudara, juga pada wanita yang telah memakai pil KB untuk waktu lama atau pada wanita



dengan riwayat penyakit adanya kanker payudara dalam keluarga.

6. **Radiasi pengion** pada daerah toraks akan meningkatkan risiko kanker payudara. Besarnya risiko bergantung kepada dosis radiasi, jangka waktu sejak pajanan, dan usia. Wanita yang mengalami iradiasi sebelum usia 30, payudara, tampaknya lebih beresiko untuk terkena kanker jenis ini. Sebagai contoh, kanker payudara terjadi pada 20% hingga 30% wanita yang mengalami iradiasi untuk limfoma Hodgkin saat remaja dan usia sekitar 20 tahun, tetapi risiko pada wanita yang diobati pada usia lebih tua tidak meningkat. Pengaruh dosis radiasi rendah tetap memiliki hubungan bermakna jika berkaitan dengan penapisan mamografi terhadap insidens kanker payudara.
7. **Faktor risiko lain**, misalnya obesitas, konsumsi alkohol, diet tinggi lemak, terbukti melalui analisis penelitian populasi. Risiko yang berhubungan obesitas terkait dengan produksi bahan hormon estrogen yang banyak berasal dari jaringan lemak.

D. Patogenesis Tumor Payudara

Penyebab kanker payudara tidak bersifat pasti tetapi sangat penting

perhatikan factor resiko. Ada 3factor resiko utama, antara lain:

) perubahan genetik,



(2) pengaruh hormonal, dan

(3) factor lingkungan.

Ad (1) Perubahan Genetik.

Kejadian mutasi gen pada epitel payudara merupakan dasar proses tumorigenesis. Mutasi gen yang muncul terjadi pada proto-onkogen dan supresor-onkogen. Peristiwa mutasi gen sel epitel payudara yang utama adalah

- a. Mutasi protoonkogen *HER2/NEU*, terjadi amplifikasi 30% kanker payudara. Gen ini adalah kelompok gen reseptor faktor pertumbuhan, dan ekspresi protoonkogen yang berhubungan dengan prognosis buruk.
- b. Amplifikasi gen RAS dan MYC juga telah dilaporkan pada sebagian kanker payudara manusia.
- c. Mutasi gen supresor tumor *RB* dan *TP53*.
- d. Mutasi gen reseptor estrogen dapat mengalami inaktivasi akibat hipermetilasi promotor, didapat, multipel, dan memiliki kombinasi perubahan mutasi beberapa subtype kanker payudara. Pembagian profil ekspresi gen kanker payudara terdiri atas empat subtype molekuler:
 1. Luminal A (reseptor estrogen-positif, *HER2/NEU*-negatif);
 2. Luminal B (reseptor estrogen-positif, *HER2/NEU* terekspresi berlebihan);
 3. *HER2/NEU* positif (*HER2/NEU* terekspresi berlebihan, reseptor estrogen-negatif); dan



4. *basal-like* (reseptor estrogen-negatif dan *HER2/NEU*-negatif). Subtipe dari profil ekspresi gen kanker payudara tersebut berhubungan perbedaan terapi. Sekitar 10% kanker payudara berhubungan dengan mutasi yang diwariskan. Wanita yang memiliki gen rentan terkait kanker payudara ini cenderung terjadi secara bilateral, dapat disertai dengan bentuk kanker familial lain (misalnya, kanker ovarium), dengan riwayat keluarga positif (misalnya, beberapa anggota keluarga setingkat yang terkena kanker sebelum menopause), dan terkait juga dengan kelompok etnik tertentu (misalnya, penduduk Ashkenazi turunan Yahudi).
- e. Mutasi gen suppressor-onkogen pada *BRCA-1* (pada lokus kromosom 17q21.3) atau *BRCA-2* (lokus kromosom 13q12-13) terjadi pada sepertiga insiden kanker payudara herediter yang berperan pada jalur perbaikan DNA. Kanker akan tumbuh bila kedua alel mengalami inaktivasi atau defektif lesi genetik pertama disebabkan mutasi sel benih (*germ line mutation*) dan mutasi kedua terjadi pada mutasi sel somatik pada tahap berikutnya. Sekitar 93% pembawa-sifat (*carrier*) mengalami perkembangan kanker menjelang usia 70 tahun, dibandingkan dengan hanya 7% wanita yang tidak menyangkut mutasi gen ini. Peran gen-gen rentan terkait kanker payudara yang terjadi karena mutasi *BRCA 1* dan *BRCA 2* jarang dijumpai pada kejadian tumor sporadik. Penyakit genetik yang terkait kanker payudara lebih jarang dijumpai, misalkan pada *sindrom Li-Fraumeni* (mutasi galur sel benih pada TP53), *Sindrom Cowden*



(mutasi galur sel benih *PTEN* juga terkait juga dengan karsinoma endometrium), dan pembawa-sifat gen ataxia-telangiectasia.

Ad (2) Pengaruh Hormon.

Kelebihan estrogen endogen, (ketidakseimbangan hormone) mempunyai peran penting terkait kanker payudara. Banyak faktor risiko yang disebutkan (masa kehidupan reproduktif yang panjang, nulipara, dan usia tua saat kelahiran. Diperkirakan hal tersebut berhubungan dengan diet, pola reproduksi, dan kebiasaan menyusui anak pertama) berakibat pada pajanan estrogen berkepanjangan yang tidak dilawan (unopposed)/ diimbangi dengan pengaruh progesteron. Tumor ovarium yang menghasilkan estrogen berhubungan dengan kanker payudara wanita postmenopause. Estrogen menstimulasi produksi factor pertumbuhan, seperti factor pertumbuhan yang bersifat transformasi (TGF- α = *transforming growth factor- α*), faktor pertumbuhan asal trombosit (PDGF = *platelet derived growth factor*), dan faktor pertumbuhan fibroblas (*FGF = fibroblast growth factor*) dan lainnya, yang akan memicu perkembangan tumor melalui mekanisme jalur *parakrin* dan *autokrin*.

Banyak faktor risiko yang disebutkan (masa kehidupan reproduktif yang panjang, nulipara, dan usia tua saat kelahiran
sidens dan mortalitas penyakit ini lima kali lebih tinggi di Amerika erikat daripada di Jepang. Perbedaan ini agaknya lebih bergantung



kepada faktor lingkungan daripada faktor genetik, karena emigran dari daerah dengan risiko rendah ke daerah risiko tinggi menunjukkan insidens seperti negara tempat tinggalnya yang baru, dan timbal balik). Diperkirakan hal tersebut berhubungan dengan diet, pola reproduksi, dan kebiasaan menyusui.

Ad (3) Variabel Lingkungan.

Pengaruh lingkungan diperkirakan bervariasi pada kejadian insidens kanker payudara pada penduduk kelompok yang secara genetik bersifat homogen dan perbedaan geografik dalam prevalensi, seperti dibahas sebelumnya.

Ras/Etnik. Risiko tertinggi untuk kanker payudara adalah pada wanita kulit putih bukan Hispanik. Walaupun demikian, wanita Amerika Hispanik, dan keturunan Afrika (*Afroamerican*) cenderung menderita kanker pada usia muda dan derajat keganasan tumor payudara yang bersifat lebih agresif dan ditemukan sudah berada pada stadium lanjut. Kesenjangan antar kelompok etnik ini diperkirakan merupakan perpaduan antara perbedaan genetik dan faktor sosial, seperti pemilihan gaya hidup dan akses untuk perawatan kesehatan.

Faktor risiko lain. Keadaan ini terjadi pada pajanan estrogen eksogen yang lama saat postmenopause, misalkan yang terjadi pada terapi sulih hormon, dimana terapi ini bermanfaat untuk

mencegah osteoporosis. Tetapi paparan hormone ini juga berkaitan dengan pemakaian terapi kombinasi estrogen-progestin jangka



pendek yang berhubungan dengan peningkatan risiko terhadap kanker payudara, sering ditemukan sudah stadium lanjut, dan insidens meningkat dijumpainya mamogram yang abnormal. Laporan dari *women's Health Initiative*(2002) menyatakan bahwa pemakaian kombinasi estrogen ditambah progesterin, lebih berisiko untuk kejadian kanker payudara. Proporsi kanker payudara pada anak pertama ternyata lebih sering beresiko, jika dilakukan pajanan estrogen berkepanjangan tipe *unopposed* (diimbangi dengan pengaruh progesterone). Tumor ovarium yang timbul dan menghasilkan estrogen berhubungan dengan kejadian kanker payudara pada wanita postmenopause.

Estrogen menstimulasi produksi faktor pertumbuhan, seperti factor pertumbuhan yang bersifat transformasi (*transforming growth factor-a*), faktor pertumbuhan asal trombosit (*platelet derived growth factor*), dan faktor pertumbuhan fibroblas (*fibroblast growth factor*) dan lainnya, yang akan memicu perkembangan tumor melalui mekanisme parakrin dan autokrin.

Lokasi yang paling sering dari tumor payudara adalah pada kuadran atas luar (50%), diikuti dengan bagian tengah (20%). Sekitar 4% wanita dengan kanker payudara mempunyai tumor primer bilateral atau lesi yang terjadi berurutan pada payudara yang sama.



E. Klasifikasi, Diagnosis, Pemeriksaan dan Terapi Kanker

Payudara

Karsinoma payudara jika ditinjau berdasarkan ada atau tidaknya penetrasi membran basal yang membatasi pertumbuhan: massa tumor berbatas disebut *karsinoma in situ*, dan bila telah terjadi penetrasi dan menyebar disebut *karsinoma invasif*. Berdasarkan klasifikasi diatas maka bentuk utama kanker payudara adalah sebagai berikut:

A. Noninvasif

1. Karsinoma duktal *in situ/ductal carcinoma in situ* (DCIS)
2. Karsinoma lobular *in situ/lobular carcinoma in situ* (LCIS)

B. Invasif

1. Karsinoma duktal invasif (*No Special Type = NST*),
2. Karsinoma lobular invasif
3. Karsinoma meduler
4. Karsinoma koloid (karsinoma musinosum)
5. Karsinoma tubuler
6. Tipe lain

1. Faktor Risiko yang Terkait

Karsinoma payudara (KPD) adalah proliferasi kelompokkan sel epitel atipik payudara yang tidak terkontrol dan membentuk pola pertumbuhan tertentu sehingga membentuk massa tumor. KPD dapat berasal dari sel epitel



kelenjar dan saluran kelenjar. Lebih kurang 10% kejadian KPD terkait herediter dan sisanya yang dominan (90%) yang terjadi akibat mutasi gen-gen BRCA1 dan BRCA2, sedangkan proporsi penyebab mutasi yang bermakna lain disebabkan mutasi gen TP53, PTEN, STK11, ATM dan PALB2.

Kerentanan genetic bermanifestasi klinis secara relative melauai adanya riwayat tumor ini pada keluarga wanita penderita baik satu ataupun lebih.

Risiko terkait riwayat keluarga akan meningkat kan resiko jika keluarga yang terkena kanker adalah turunan pertama atau jika KPD terjadi pada penderita wanita premenopause yang bilateral dan pada kanker *multiple*, dimana kerentanan untuk onset KPD terjadi lebih dini, dan berlokasi *multiple* (misal, KPD dan Kanker ovarium) dan adanya sindrom terkait jenis kanker yang jarang. KPD terjadi karena ada kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan differensiasi, sehingga sel yang tumbuh tak terkendali. Usia penderita KPD usia termuda adalah 20–29 tahun, sedangkan usia tertua adalah 80–89 tahun dengan penderita terbanyak pada wanita yang berumur 40–49 tahun dan letak KPD terbanyak di kuadran lateral atas. Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa beberapa faktor risiko yang berhubungan dapat meningkatkan risiko atau kemungkinan untuk terjadinya KPD (Hoda, 2014b) (Miricescu et al., 2021): Prevalensi tumor payudara pada wanita dibanding



pria 99 :1. Risiko terjadinya KPD meningkat dua kali lipat pada usia 40–50 tahun. Factor resiko lainnya adalah

- Riwayat adanya tumor jinak payudara sebelumnya
- Faktor genetik mutasi gen BRCA1 dan BRCA2, yaitu gen suseptibilitas KPD, dengan probabilitas adalah sebesar 80%.
- Faktor hormonal jika tidak diselingi perubahan hormon pada saat kehamilan.
- Usia menarche dini dapat meningkatkan risiko karena terlalu cepat mendapat paparan dari estrogen.
- Menopause yang terlambat meningkatkan risiko 3%.
- Usia pada saat kehamilan pertama >30 tahun.
- Nulipara/belum pernah melahirkan mempunyai risiko sebesar 30% dibandingkan dengan wanita yang multipara.
- Menyusukan ASI dapat menurunkan risiko karena penurunan level estrogen dan sekresi bahan–bahan karsinogenik.
- Pemakaian kontrasepsi oral dalam waktu lama, diet tinggi lemak, alkohol, dan obesitas.

Perkiraan faktor risiko relatif pada riwayat keluarga yang memiliki keluarga perempuan dengan karsinoma ovarium berkisar % dibanding ibu/ saudara kandung penderita KPD atau keluarga yang berhubungan satu tingkat pertama yaitu sebesar >2%.



Sedangkan pada riwayat pribadi, penderita yang pernah melakukan biopsi payudara dengan LCIS/DCIS memiliki risiko lebih tinggi yaitu sebesar 8–10% dibanding dengan hiperplasia duktal atipikal yaitu sebesar 4–5%. Faktor riwayat reproduksi menarche dini yang terlambat (>30 tahun) / nulliparitas memiliki risiko sekitar 2%. Pada pengguna kombinasi estrogen/progesteron berisiko sekitar 2% dibandingkan dengan pengguna kontrasepsi oral, peningkatan berat badan usia dewasa, gaya hidup menetap dan konsumsi alkohol, yaitu sekitar 1,5% (Hoda, 2014b).

2. Klasifikasi Karsinoma

Payudara KPD dapat diklasifikasikan menjadi berbagai jenis berdasarkan sel karsinoma yang terlihat dibawah mikroskop (Smith et al., 2013). Berdasarkan American Cancer Society (2013) (Smith et al., 2013), KPD diklasifikasikan sebagai berikut:

a. *Ductal Carcinoma in Situ* (DCIS, dikenal juga sebagai karsinoma intraductal non invasif) adalah KPD yang non–invasif atau pra–invasif. DCIS terdiri atas seperti sel– sel tumor epitel atipik yang melapisi dinding duktus berbentuk kelenjar tetapi belum menyebar (menginvasi) dan tidak dapat mengalami metastasis). Namun pada beberapa kasus dapat berubah menjadi karsinoma invasif.

b. *Invasive Ductal Carcinoma*

Invasive Ductal Carcinoma (IDC) dimulai dari saluran susu (duktus) payudara, menerobos dinding duktus, dan tumbuh ke dalam jaringan lemak payudara. Karsinoma dapat menyebar



(metastasis) ke bagian lain dari tubuh melalui sistem limfatik dan aliran darah. Sekitar 8 dari 10 KPD invasif yang menginfiltrasi karsinoma duktal.

c. *Invasive Lobular Carcinoma* (ILC), dimulai dalam kelenjar (lobulus) yang memproduksi susu. Seperti IDC, karsinoma dapat menyebar (metastasis) ke bagian lain dari tubuh. Sekitar 1 dari 10 payudara invasif karsinoma adalah ILC.

d. KPD inflamasi merupakan jenis KPD invasif yang jarang sekitar 1% hingga 3% dari seluruh KPD. Biasanya tidak ada benjolan tunggal atau tumor. Sebaliknya, inflamasi KPD membuat kulit pada payudara terlihat merah dan terasa hangat. Hal ini juga dapat memberikan kulit payudara tebal, gambaran yang terlihat seperti *an orange peel*.

e. Penyakit Paget dari puting KPD ini dimulai di duktus payudara dan menyebar ke kulit puting dan kemudian ke areola. Karsinoma ini jarang terjadi, terhitung hanya sekitar 1% dari semua kasus KPD. Kulit puting dan areola sering muncul krusta, bersisik, dan merah, dengan area perdarahan atau mengalir. Pasien mungkin melihat terbakar atau gatal.

f. Tumor Phylloides

Tumor payudara ini merupakan tumor stroma / jaringan ikat payudara. Nama lain untuk ini tumor termasuk tumor phylloides dan phylloides cystosarcoma. Tumor ini biasanya jinak tetapi dapat berkembang menjadi ganas.



- g. Angiosarkoma, tumor pembuluh darah yang ganas dan jarang terjadi pada payudara. Biasanya berkembang sebagai komplikasi dari pengobatan radiasi sebelumnya dengan riwayat sekitar 5 sampai 10 tahun setelah radiasi. Karsinoma ini cenderung tumbuh dan menyebar dengan cepat.

3. Diagnosis

a. Tanda dan Gejala KPD

Gejala–gejala yang dapat terjadi pada KPD adalah adanya benjolan pada payudara yang dapat diraba dengan tangan. Semakin lama benjolan tersebut semakin mengeras dan bentuknya tidak beraturan. Perubahan kulit pada payudara antara lain kulit tertarik (*skin dimpling*), benjolan yang dapat dilihat (*visible lump*), gambaran kulit jeruk (*peu d'orange*), eritema dan ulkus. Kelainan pada puting diantaranya puting tertarik (*nipple retraction*), eksema, dan cairan pada puting (*nipple discharge*) (Gleadle, 2007).

b. Anamnesis dan Pemeriksaan Fisik

Anamnesis pada penyakit KPD bisa didapatkan keluhan benjolan, nyeri, *nipple retraction*, krusta pada areola, kelainan kulit berupa tarikan pada kulit (*skin dimpling*), gambaran kulit jeruk (*peau d'orange*), ulserasi, perubahan warna kulit, dan ruam sekret dari puting. Ditanyakan pula apakah terdapat penyebaran pada regio kelenjar limfe, seperti timbulnya benjolan di aksila, di leher atau tempat lain. Selain itu, perlu digali juga mengenai:



- 1) Riwayat penyakit dahulu apakah sebelumnya pernah mengalami penyakit payudara, benjolan, mamografi, biopsi, masektomi, radioterapi, atau kemoterapi.
- 2) Riwayat penggunaan tamoksifen atau estrogen, riwayat KPD dalam keluarga. Gejala sistemik yang mungkin menunjukkan penyakit metastatik, seperti penurunan berat badan, nyeri punggung, ikterus, atau limfadenopati (Gleadle, 2007).

4. Pemeriksaan Fisik

Pemeriksaan fisik terdiri dari inspeksi dan palpasi. Inspeksi payudara dilakukan untuk melihat bentuk, ukuran, simetris serta abnormalitas kulit seperti adanya benjolan yang tampak, eritema, tarikan pada kulit (*skin dimpling*), luka/ulkus, gambaran kulit jeruk (*peau d'orange*), nodul satelit, dan kelainan areola serta puting seperti puting tertarik (*nipple retraction*), eksema, dan keluarnya cairan dari puting (Hoda, 2014b).

Pada palpasi pasien diminta untuk berada dalam posisi berbaring, mengangkat kedua lengan keatas kepala dengan pundak diganjal bantal kecil. Kemudian dilakukan palpasi payudara menggunakan bantalan tiga jari tangan yaitu bagian polar distal jari 2,3, dan 4. Jika ditemukan benjolan maka periksa dengan teliti lokasi, ukuran, konsistensi, permukaan, mobilitas, batas tegas/tidak, nyeri serta hubungan dengan 20 kulit di atasnya atau struktur dibawahnya.

kemudian lakukan pula palpasi pada limfadenopati aksilaris, klavikularis dan supraklavikularis (Gleadle, 2007; Hoda, 2014b).



5. Pemeriksaan Penunjang

Pemeriksaan penunjang pada KPD yang dapat dilakukan antara lain mammografi, CT scan pada payudara, ultrasonografi (USG), MRI payudara, pemeriksaan biopsi jarum halus, pemeriksaan laboratorium, pemeriksaan histopatologi dan tumor marker untuk *follow up*. Pemeriksaan histopatologi masih menjadi *gold standard* diagnosis KPD yang dilakukan dengan cara memeriksa contoh jaringan tumor yang diambil melalui biopsi (Smith et al., 2013)

Salah satu cara biopsi yaitu *Fine Needle Aspiration Biopsy* (FNAB) dengan menggunakan jarum tipis dengan pusat berrongga untuk menghapus sampel sel dari daerah yang mencurigakan untuk menentukan jenis sel karsinoma jinak/ganas (Yu et al., 2012). Pemeriksaan patologi anatomi lain yang paling penting adalah mengetahui status ER (*Estrogen Receptor*), PR (*Progesteron Receptor*) dan HER-2 untuk pemilihan terapi yang tepat (Kementerian Kesehatan RI, 2015).

6. Terapi KPD

Tujuan utama pengobatan KPD pada tahap awal adalah untuk mengangkat tumor dan membersihkan jaringan sekitar tumor. Tumor primer diterapi dengan pembedahan, yaitu *lumpectomy* dimana tumor tersebut diangkat, atau dengan pembedahan *mastectomy*, dimana massa tumor karsinoma diangkat, sebagian atau seluruh payudara

angkat. Selain itu ada radioterapi adjuvan, dimana terapi ini berfungsi untuk mengurangi risiko rekurensi tumor lokal setelah



operasi. Selain pembedahan dan radioterapi, juga dilakukan kemoterapi dan terapi hormon (Hoda, 2014a).

a. Kemoterapi

Kemoterapi adalah pemberian obat untuk membunuh sel-sel kanker, dapat diberikan dalam bentuk infus atau oral (tablet). Kemoterapi biasanya diberikan dalam bentuk kombinasi agar lebih banyak sel karsinoma yang dapat dibunuh melalui berbagai jalur dengan mekanisme berbeda. Umumnya terapi agresif (kombinasi lebih dari 2 macam modalitas, antara lain: radiasi, kemoterapi, hormonal, target terapi, dan antibodi monoklonal dapat diberikan pada pasien dengan kondisi dan keadaan umum yang baik dengan tujuan menghilangkan tumor dengan cepat.

b. Radiasi

Radioterapi adalah pengobatan dengan sinar-X yang berintensitas tinggi dan berfungsi untuk membunuh sel kanker. Radiasi biasanya dilakukan setelah pembedahan, untuk membersihkan sisa-sisa sel karsinoma yang masih ada. Radiasi bisa mengurangi risiko kekambuhan hingga 70%.

c. Terapi Hormonal

Terapi hormon dipakai untuk melawan sel tumor yang pertumbuhannya dipengaruhi oleh reseptor hormon yang positif atau tumor dengan status ER (estrogen) atau PR (progesteron) positif pada pemeriksaan jaringan patologi anatomi. Terapi



hormonal bekerja melalui dua cara yaitu menurunkan jumlah hormon estrogen dalam tubuh dan menghambat kerja estrogen dalam tubuh. Estrogen dapat merangsang pertumbuhan tumor, terutama jenisnya yang tergantung pada reseptor hormon. Terapi hormonal tidak efektif jika dipakai pada jenis tumor yang pertumbuhannya tidak dipengaruhi oleh reseptor hormon.

d. Terapi Fokus Sasaran (*targeted therapy*)

Terapi fokus sasaran (*targeted therapy*) adalah jenis terapi yang menghentikan pertumbuhan sel-sel karsinoma dengan cara menghambat molekul atau protein tertentu yang ikut serta dalam proses perubahan sel normal menjadi sel karsinoma yang ganas.

Terapi fokus sasaran lebih efektif dari terapi lainnya dan tidak berbahaya bagi sel normal. Jenis-jenis terapi fokus sasaran adalah:

1) Terapi Antibodi Monoklonal.

Antibodi monoklonal adalah substansi yang akan mengenal dan mengikat suatu target spesifik (protein) pada permukaan sel kanker. Setiap antibodi monoklonal hanya mengenal satu target protein, atau antigen. Terapi ini memiliki cara kerja seperti antibodi yang ada dalam sistem kekebalan tubuh manusia dan dapat digunakan secara tunggal, atau kombinasi dengan kemoterapi. Sekitar 20–30% pasien KPD memiliki status HER-2 positif, dimana jenis ini merupakan jenis karsinoma yang lebih ganas daripada jenis lainnya.



Untuk tujuan ini telah dikembangkan **terapi antibodi monoklonal khusus** untuk menyerang sel tumor dengan **status HER-2 positif** saja, yaitu ***trastuzumab*** yang telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan tumor dan mematikan sel tumor (Onitilo et al., 2009).

2) Terapi angiogenesis.

Terapi **anti-angiogenesis** bekerja dengan cara **menghambat pasokan nutrisi ke sel karsinoma** sehingga sel karsinoma mengecil dan mati. **Obat ini selalu diberikan kombinasi dengan sitostatika (kemoterapi)**. Anti angiogenesis sering digunakan untuk pengobatan KPD adalah ***bevacizumab*** (Onitilo et al., 2009).

F. Derajat Keganasan Histologik KPD

Penilaian *grading* atau derajat keganasan diterapkan dengan cara melakukan penilaian morfologi sel tumor dari jaringan tumor. sehingga bisa menilai tipe histopatologi KPD. Tipe histopatologi tumor berguna dalam menilai prognosis dan sekitar 60-75% tipe histopatologi karsinoma payudara adalah *no special type* (NST) (Hoda, 2014a).

Menilai gradasi histopatologi karsinoma payudara dilakukan dengan menilai derajat diferensiasi pada sediaan histopatologi yang diwarnai dengan *hematoxylin-eosin*.

Penilaian dilakukan secara mikroskopik dari pola pertumbuhan (diferensiasi), jumlah sel yang mengalami mitosis, dan



atipia sel tumor. Sel dianggap semakin ganas jika perubahan bentuk semakin tidak terkendali dan tidak mirip dengan sel asal.

Kriteria penilaian derajat keganasan menggunakan kriteria WHO menurut *System Nottingham Combined Histologic Grade (Elston-Ellis Modification of Scarff – Bloom - Richardson Grading System)* atau biasa disebut dengan *Nottingham Grading-System*.

Tabel 2. Bloom-Richardson Grading Histopatologi Karsinoma Payudara

Tumor Tubule Formation	Score
>75% of tumor cells arranged in tubules	1
>10% and <75%	2
<10%	3
Number of Mitoses (low power scanning (x100), find most mitotically tumor area, proceed to high power (x400))	
<10 mitoses in 10 high-power fields	1
>10 and <20 mitoses	2
>20 mitoses per 10 high power fields	3
Nuclear Pleomorphism (nuclear grade)	
Cell nuclei are uniform in size and shape, relatively small, have dispersed chromatin patterns, and are without prominent nucleoli	1
Cell nuclei are somewhat pleomorphic, have nucleoli, and are intermediate size	2
Cell nuclei are relatively large, have prominent nucleoli or multiple nucleoli, coarse chromatin patterns, and vary in size and shape	3

Table 3. skor Bloom Richardson Grade

Iloom-Richardson (Nottingham) Combined Scores	Differentiation/ BR Grade	ICD 0-3 6th Digit
3,4,5	Well-differentiated (BR low grade)	1
6,7	Moderately differentiated (BR intermediate grade)	2
8,9	Poorly differentiated (BR high grade)	3

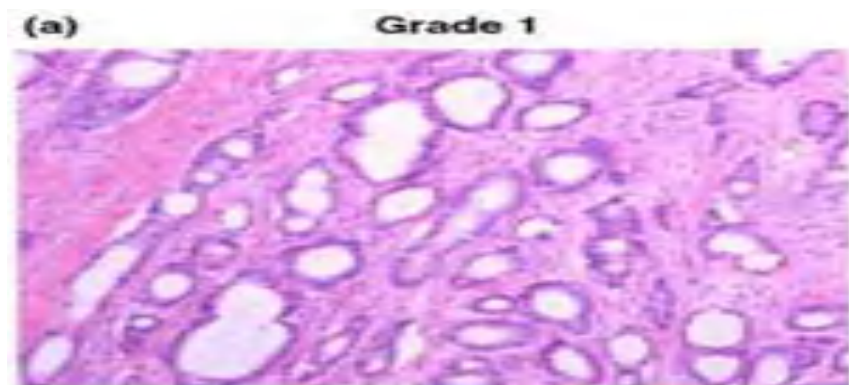


Hasil akhir dari skor dengan menghitung skor total ketiga kriteria yaitu pola tubulus, jumlah mitosis dan atipia inti sel tumor.

Tabel 4. Intepretasi Bloom-Richardson Grading Histopatologi KPD

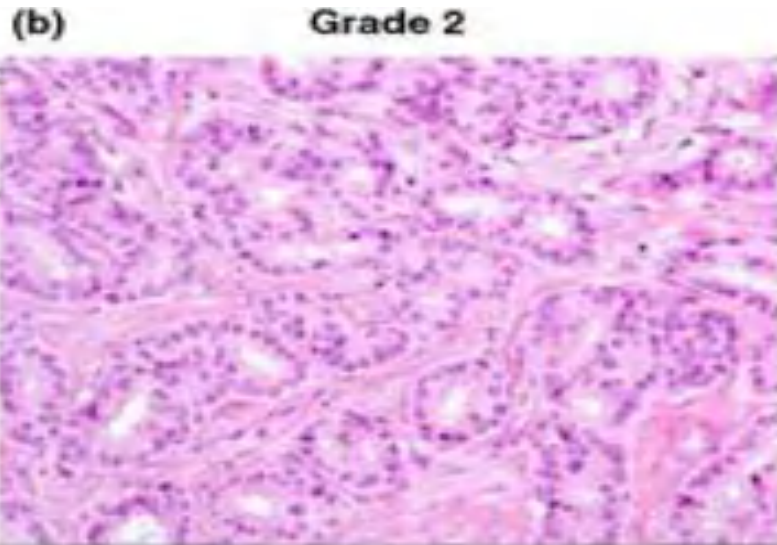
Gx	<i>Grade cannot be assessed</i>
G I (skor 3-5)	<i>Low combined histologic grade (favourable)</i>
G II (skor 6-7)	<i>Intermediate combined histologic grade (moderately favourable)</i>
G III (skor 8-9)	<i>High combined histologic grade (unfavourable)</i>

Karsinoma payudara dengan diferensiasi baik memiliki prognosis yang lebih baik. Lesi *high-grade* umumnya tidak mengekspresikan reseptor estrogen, reseptor progesteron, dan HER-2. Sebaliknya jenis *low grade* memiliki reseptor estrogen, reseptor progesterone, *low ploriferation rate*, sedikit angiogenesis periduktal, dan tidak memiliki HER-2. Gradasi *intermediate* mempunyai karakteristik campuran ekspresi. Gradasi histopatologi (*Nottingham Combined Histologic Grade*) penting dalam menentukan prognosis dan optimalisasi pengobatan (Rakha et al., 2010).

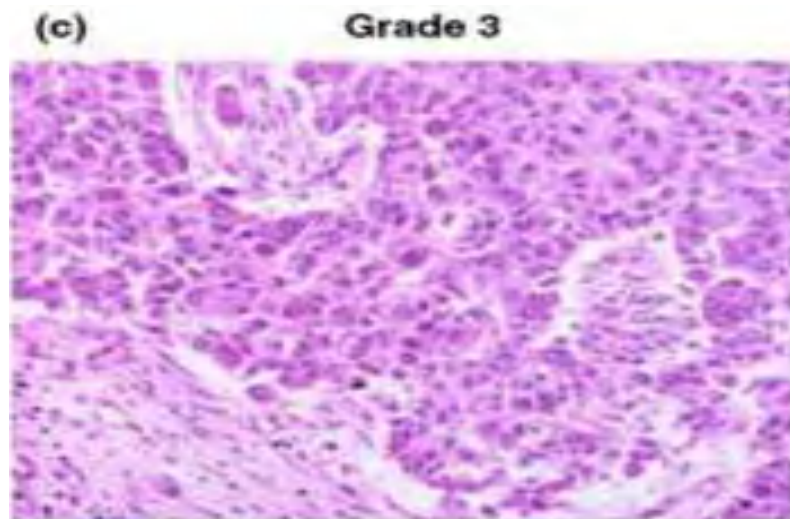


Gambar 7. Histologik jenis dari karsinoma *Well-Differentiated*, pembentukan tubulus (>75%), tingkat atipia ringan dan jumlah mitosis rendah.





Gambar 8. Moderately Differentiated Tumor (Grade II) dengan gambaran tidak ada pembentukan tubulus (<10%).



Gambar 9. Histologi KPD High grade (grade 3)

Penilaian derajat diferensiasi karsinoma payudara Nottingham Grading System (NGS) memiliki keterbatasan menilai prognostik *tumor high grade (grade 3)* yang memiliki HER-2 positif dan *triple negative*. Tumor ini secara tipikal memiliki penanda gen yang berprognosis buruk.



Nomenklatur yang digunakan untuk KPD sesuai kriteria *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) dikelompokkan menjadi:




- a. *Grade I*: karsinoma dengan diferensiasi baik (*well differentiated*)
- b. *Grade II*: karsinoma diferensiasi sedang (*moderately differentiated*)
- c. *Grade III*: karsinoma dengan diferensiasi jelek (*poorly differentiated*)
- d. *Grade IV*: karsinoma anaplastik atau *undifferentiated*.

Grade III dan *IV* dikategorikan sebagai *High Grade*. Manfaat lain dari penentuan derajat diferensiasi adalah untuk menentukan jenis terapi yang akan diberikan. Pada derajat diferensiasi buruk, di mana pertumbuhan dan penyebaran sel dianggap lebih cepat atau agresif, dibutuhkan terapi tambahan selain definitif, yakni dengan pemberian kemoradiasi. Sistem *grading* dapat menjadi faktor prognosis KPD. Derajat keganasan sedang (*Grade II*) merupakan tumor terbanyak diikuti oleh tumor *Grade I*, dan *Grade III* (M. H. Zhang et al., 2014). Derajat keganasan yang tinggi dikaitkan dengan status HER-2 yang positif. Menurut penelitian status HER-2 (+) berpengaruh terhadap derajat keganasan yang tinggi (*Grade III*) dan

ER (-) / PR (-), dan pada kondisi *triple negative* untuk imunoekspresi ER, PR dan HER-2 sering menunjukkan derajat keganasan tinggi



yang *negative responsive* terhadap terapi hormonal (Semenza, 2016; M. H. Zhang et al., 2014).

Parameter	1	Score 2	3
 Tubule formation	>75%	10-75%	<10%
 Nuclear pleomorphism	Absent*	Moderate	Marked
 Mitotic count**	<9	9-17	>17
Final score	3	4 5	6 7 8 9
	Grade I		Grade II
			Grade III

Gambar 10. Cara standar penilaian menurut Nottingham Richardson

G. Reseptor Hormonal KPD

Beberapa sel KPD memiliki reseptor yang memungkinkan hormon atau protein masuk ke dalam sel kanker. KPD memiliki reseptor untuk hormon estrogen, progesteron, dan protein HER-2 (Arslan et al., 2011).

a) Reseptor Estrogen

Reseptor estrogen adalah suatu faktor yang dapat diperiksa untuk memprediksi KPD. Paparan oleh hormone estrogen adalah faktor risiko untuk terjadinya KPD. Hormon ini menimbulkan efeknya melalui reseptor estrogen, yang terdiri dari 2 sub tipe, ER α dan ER β , yang merupakan protein pada inti sel. Keduanya merupakan faktor transkripsi yang memperantarai kerja estrogen. Keduanya mengikat estradiol pada lokasi yang sama, namun berbeda afinitas dan respon yang dihasilkannya. ER α ditemukan lebih dulu, dan kemudian diubah namanya dari ER menjadi ER α



saat ditemukan sub tipe yang kedua. ER α positif pada hampir 70% karsinoma payudara, namun nilai prediktifnya tidak ideal karena sekitar sepertiga KPD yang metastase dengan ER(+) tidak merespon terapi hormonal. ER β lebih sedikit dikenal, dan sebagian besar data klinis yang tersedia mengacu pada ER α .

ER α berperan dalam proliferasi sel, sebaliknya ER β dapat menghambat proliferasi sel melalui penghambatan transkripsi gen dan berperan sebagai supresor tumor (Fox et al., 2008). Kedua bentuk reseptor estrogen ini dikode oleh gen yang berbeda, yaitu ESR1 dan ESR2 pada kromosom 6 dan 14 (6q25 dan 14q). Kedua reseptor ini diekspresikan secara luas pada berbagai jaringan, yang berbeda, dengan pola ekspresi yang berbeda pula. ER α ditemukan pada endometrium, sel-sel KPD, sel stroma ovarium, dan di hipotalamus. ER β ditemukan pada ginjal, otak, tulang, jantung, mukosa usus, prostat, dan sel-sel endotel. ER dalam fase unligand merupakan reseptor sitoplasma, namun penelitian menunjukkan adanya fraksi ER yang bergeser ke dalam inti (Levin & Pietras, 2008).

Sebagian ER terletak pada permukaan membran sel dengan perlekatan pada caveolin-1 dan membentuk kompleks dengan protein G, striatin, reseptor tyrosin kinase (misal: EGFR dan IGF-1) dan non reseptor tyrosin kinase (misal: Src). Melalui striatin ER meningkatkan kadar Ca²⁺ dan NO. Melalui reseptor tyrosin kinase, beberapa signal dikirimkan ke inti melalui jalur Mitogen Activated



Protein Kinase (MAPK/ERK) dan jalur phosphoinositide 3-kinase (PI2K/AKT). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 β) menghambat transkripsi melalui ER yang terletak di inti dengan menghambat fosforilasi 28 serine 118 dari nuclear ER α . Fosforilasi ini menghilangkan efek inhibitor ER. Namun letak dan fungsi reseptor ini masih merupakan suatu kontroversi.

Terapi endokrin untuk KPD melibatkan *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMS) yang bertindak sebagai ER antagonis pada jaringan payudara atau inhibitor aromatase. SERM yang lain, raloxifene telah digunakan sebagai kemoterapi preventif untuk wanita yang berisiko tinggi mengidap KPD. Obat kemoterapi lain, Faslodex yang bertindak sebagai antagonis juga meningkatkan degradasi ER (Bundred, 2005). Sekitar dua per tiga wanita penderita karsinoma payudara berumur 50 tahun adalah ER(+). Hal ini mempunyai implikasi terapeutik yang signifikan (Payne et al., 2008). Secara umum konsentrasi ER lebih rendah pada wanita premenopause daripada post menopause. ER yang mengalami overekspresi pada sekitar 70% KPD disebut ER(+). Adanya ER(+) berhubungan secara signifikan dengan derajat inti yang tinggi dan derajat histopatologi yang rendah, tidak adanya nekrosis, dan usia pasien yang lebih tua (Rosai, 2004).

Mekanisme proses karsinogenesis pada KPD dapat terjadi melalui ikatan estrogen pada ER, menstimulasi proliferasi sel-sel payudara yang menimbulkan peningkatan pembelahan sel dan



replikasi DNA yang menimbulkan mutasi, dan metabolisme estrogen memproduksi limbah yang 29 toksik terhadap gen dan metabolit yang menyebabkan mutasi. Kedua proses akan menyebabkan inisiasi, promosi, dan proses karsinogenesis.

Hal ini menyebabkan ER mempunyai peran penting dalam proses karsinogenesis, dan penghambatannya melalui targeting endokrin, baik secara langsung dengan menggunakan agonis lemah estrogen (*selective estrogen receptor modulators*) maupun secara tidak langsung dengan mengeblok perubahan androgen menjadi estrogen (misalnya aromatase, inhibitor), merupakan terapi terhadap KPD (Yager & Davidson, 2006). Tumor payudara ER(+)/PR(+) mempunyai risiko mortalitas lebih rendah daripada ER(-)/PR(-).

b) Reseptor Progesteron

Reseptor progesteron (PR) adalah gen yang diregulasi oleh estrogen, karena itu ekspresinya mengindikasikan adanya jalur ER yang sedang aktif. Penilaian ekspresi PR dapat membantu memprediksi respons terhadap terapi hormonal secara lebih akurat. Sejalan dengan hal ini ada beberapa fakta yang menyatakan bahwa tumor-tumor dengan ekspresi PR yang positif mempunyai respons lebih bagus terhadap tamoxifen, baik pada penderita dengan metastase dan sebagai terapi adjuvant.

Sekitar 55–65% KPD adalah PR(+). Tumor-tumor PR(+) menunjukkan prognosis lebih baik daripada PR(-). Dari penelitian–



penelitian yang sudah ada telah dinyatakan bahwa PR(+) sangat sedikit didapatkan pada tumor dengan ER(-), sehingga PR(+) kuat pada kasus dengan ER yang tampaknya negatif bisa merupakan indikator adanya ER(-) palsu (Ellis et al., 2003).

c) *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER-2)

HER-2 merupakan anggota dari family Erb dari reseptor transmembran tirosin kinase yang dikode oleh gen HER-2. Family ini termasuk reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR), HER-2, HER-3, dan HER-4. HER-2 ini berfungsi untuk mengatur pertumbuhan sel, diferensiasi sel, dan kelangsungan hidup. Amplifikasi gen HER-2 terjadi pada 20% sampai 25% dari KPD, dan berhubungan dengan diferensiasi buruk, keganasan tumor yang lebih tinggi, resistensi terhadap terapi, kekambuhan yang tinggi, insiden yang lebih tinggi dari metastasis otak, prognosis buruk, presentase sel yang berproliferasi lebih tinggi, aneuploid DNA, dan reseptor hormonal yang lebih sedikit (reseptor estrogen dan reseptor progesteron) (Chabner & Longo, 2011).

Gen HER-2 merupakan proto-onkogen yang ditemukan pada kromosom 17 dan berfungsi sebagai reseptor membran sel. Gen HER-2 mengkode glikoprotein transmembran 185-kDa yang memiliki aktifitas intrinsik protein kinase. Gen HER-2 berperan dalam regulasi pertumbuhan, proliferasi, dan pembelahan sel normal, namun reseptor mengekspresikan 33 di permukaan sel dalam jumlah sedikit. HER-2 terdiri atas domain ekstraseluler,



domain transmembran, dan domain intraseluler. Peningkatan ekspresi gen HER-2 menyebabkan peningkatan proliferasi, metastasis, dan menginduksi angiogenesis dan anti-apoptosis. Belakangan ini HER-2 telah dikategorikan sebagai pemeriksaan rutin, karena fungsinya sebagai petanda prognosis kanker. HER-2 positif (+) sering dihubungkan dengan diferensiasi buruk, metastase ke kelenjar getah bening, rekurensi, dan tingkat kematian yang tinggi sehingga prognosnya buruk.

Mekanisme sel penyebab prognosis buruk pada overekspresi HER-2 adalah overekspresi HER-2 dapat meningkatkan metastasis sel-sel kanker, seperti angiainvasi dan angiogenesis, selain itu juga dapat menyebabkan resistensi terhadap terapeutik sehingga menyebabkan respon buruk terhadap terapi, hal ini mungkin juga berhubungan dengan tidak adanya respon hormon steroid pada HER-2(+). Selain itu proliferasi yang tinggi dengan karakteristik fase-S yang tinggi yang diduga berhubungan dengan ukuran tumor.

HER-2 memiliki korelasi yang sangat kuat dengan tumor grading tinggi, kurangnya reseptor estrogen, dan meningkatnya level S-phase, MIB-1, Ki-67 dan ekspresi HIF-1 (Laughner et al., 2001; Majumder et al., 2021; Shokouh et al., 2015). Peneliti lain yang melakukan penelitian terhadap sel kanker dari benih sel

DHSF-BR16 yang diambil dari pasien dengan ekspresi HER-2 yang tinggi dan ER (-) dan PR (-) memiliki karakteristik fenotipik



utama yang berkaitan dengan imortalitas sel kanker, resistensi terhadap obat antikanker doxorubicin and epirubicin (Majumder et al., 2021; Nobili et al., 2021; Shokouh et al., 2015).

Tabel 5. Pembagian Molekuler berdasarkan reseptor hormonal kaitannya dengan derajat keganasan pada KPD (Ellis et al., 2003).

Grade HER-2	Deskripsi	Interpretasi
0	Tidak ada reaktivitas/reaktivitas pada membran <10% dari sel tumor	Negatif
1	Samar/reaktivitas membran hamper tidak terlihat pada >10% sel tumor. Sel tumor imunoreaktif hanya sebagian dari membran	Negatif
2	Reaktivitas membran lemah sampai sedang terlihat pada >10% sel tumor	Reaktivitas <i>borderline</i>
3	Reaktivitas membran kuat terlihat pada >10% sel tumor	Positif

H. Pembagian Jenis Molekular KPD

Menggunakan profil ekspresi gen, jenis molekul kanker payudara terbagi atas beberapa tipe yang berfungsi untuk menentukan jenis kanker payudara, yang terdiri atas ekspresi tiga penanda tumor:

1. Status reseptor ER-estrogen.
 2. Status reseptor PR-progesteron.
- HR-mewakili penilaian bersama status ER dan PR.
 - Status reseptor 2 faktor pertumbuhan epidermal manusia-HER2.
 - HR+/HER2– sesuai dengan subtipe Luminal A.
 - HR+/HER2+ sesuai dengan subtipe Luminal B.
 - HR–/HER2+ sesuai dengan subtipe yang diperkaya HER2.
 - HR–/HER2– sesuai dengan subtipe triple negatif.



Yang paling sering adalah HR+/HER-, terhitung sekitar 70% dari kanker payudara.

Prognosis berbeda untuk setiap jenis molekul. Kanker payudara luminal A adalah reseptor hormon positif (reseptor estrogen dan/atau reseptor progesteron positif), HER2 negatif, dan memiliki kadar protein Ki-67 yang rendah, yang membantu mengontrol seberapa cepat sel kanker tumbuh. Kanker luminal A adalah kanker tingkat rendah, cenderung tumbuh lambat dan memiliki prognosis terbaik: 80-85% kelangsungan hidup 5 tahun. Kanker payudara luminal B adalah hormon-reseptor-positif (reseptor estrogen dan/atau reseptor progesteron-positif), dan HER2 positif atau HER2 negatif dengan kadar Ki-67 yang tinggi. Status ekspresi proliferasi terkait gen adalah salah satu faktor terpenting dari perbedaan antara luminal A dan luminal B kanker payudara. Kanker luminal B umumnya tumbuh sedikit lebih cepat daripada kanker luminal A dan prognosis mereka lebih buruk.

Kanker payudara yang diperkaya HER2 adalah reseptor hormon negatif (reseptor estrogen dan reseptor progesteron negatif) dan HER2 positif. Kanker yang diperkaya HER2 cenderung tumbuh lebih cepat dari kanker luminal dan dapat memiliki prognosis yang lebih buruk: sekitar 50-60% kelangsungan hidup tahun. Mereka sering berhasil diobati dengan terapi bertarget yang ditujukan untuk

protein HER2. Kanker payudara triple-negatif/seperti basal adalah hormon-reseptor negative (reseptor estrogen dan reseptor



progesteron negatif) dan HER2 negatif, menjadi lebih ER umum pada wanita dengan mutasi gen BRCA1. Tidak ada kecocokan yang sempurna antara kanker payudara seperti basal dan kanker payudara triple-negatif.

Dua penanda molekuler utama KPD, PR dan HER2, merupakan 2 marker dasar dalam penggambaran klasifikasi dan terapi KPD. Pada kasus "Triple-negative" KPD (TNBCs) (ER -, PR -, dan ekspresi HER2—) adalah jenis keganasan agresif yang tidak responsif terhadap target saat ini terapi dengan hormonal.

Sebaliknya, profil mRNA tumor payudara berbeda sub tipe (luminal, HER2 +, dan basal-like) sangat berbeda. Ekspresi dan status mutasi banyak tumor penekan dan onkogen telah dianalisis dalam DCIS dan IDC —Termasuk TP53, PTEN, PIK3CA, ERBB2, dan MYC — dan perbedaan telah ditemukan menurut sub tipe tumor tetapi bukan tahap histologis. Misalnya, mutasi pada TP53 lebih sering pada sub tipe basal-like dan HER2 + dibandingkan dengan tumor luminal ; dalam kasus seperti basal, PIK3CA jarang bermutasi, tetapi PTEN sering hilang; dan amplifikasi ERBB2 spesifik untuk sub tipe HER2 +. Studi pertama menunjukkan bahwa ekspresi tinggi COX-2 dan Ki67 pada DCIS berkorelasi dengan risiko kekambuhan lokal yang lebih tinggi dan juga kelainan yang terlibat dalam jalur Rb sebagai kontributor potensial untuk perkembangan invasif. Studi

dua diidentifikasi kerja sama fungsional antara ERBB2 dan 14-3-3 yang mungkin meningkatkan risiko perkembangan invasif melalui



promosi transisi epitel ke mesenkimal. Keterbatasan utama keduanya investigasi adalah penggunaan kohort pasien kecil, sehingga meningkat probabilitas mendeteksi asosiasi yang mungkin tidak berlaku studi selanjutnya. Pemahaman yang lebih baik tentang lesi DCIS dapat memberikan strategi untuk menangkap invasi pada tahap pramaligna.

Pertumbuhan hormon yang terjadi secara independen sering disebabkan oleh kelainan pada jalur pensinyalan faktor pertumbuhan tersebut sebagai EGFR, HER2, pensinyalan *MAPK* melalui *ERK1/2*, atau *IGFR via PI3K*, yang keseluruhan dipengaruhi oleh HIF-1 α . Protein *HIF-1* juga bisa menjadi penanda (marker) prognostik independen pada kedua metastase KPD pada Kelenjar Getah Bening (KGB) yang negative (-) serta metastase KPD pada KGB yang positif (+). Derajat histologic keganasan KPD yang berderajat tinggi, dengan hasil ER (-) dan PR (-) dan terdapat daerah nekrotik jaringan massa tumor juga berhubungan dengan positifitas protein HIF-1 tetapi hubungan antara derajat keganasan histopatologik, status ER dan ekspresi HIF-1 berbeda antara berbagai penelitian. Penelitian menunjukkan bahwa ekspresi HIF-1 berkaitan dengan hilangnya reseptor estrogen pada sel tumor sehingga dapat menyebabkan resistensi kemoterapi. Tetapi HIF-1 bukan menjadi prediktor dari respon terapi dengan Tamoksifen

sebagai terapi antihormonal karena terapi dengan Tamoksifen responsif pada *estrogen reseptor* positif (Kronblad et al., 2006).



I. Faktor Prognosis KPD

Faktor prognostik yang paling penting dalam hal pengobatan dan prediktif penyakit KPD adalah metastasis kelenjar getah bening aksila, stadium tumor, ukuran tumor, tingkat diferensiasi, invasi limfatik, status hormonal dan metastasis jauh.

Penelitian di Turki menunjukkan bahwa prognosis karsinoma payudara ditentukan oleh metastasis kelenjar getah bening aksila, stadium tumor, ukuran tumor, tingkat diferensiasi, invasi limfatik, status hormonal dan metastasis jauh yang disertai pemeriksaan imunoekspresi dari p16 dan Bcl-2. Penelitian membentuk ada korelasi positif antara imunoekspresi gen p16 dengan peningkatan pembentukan tubulus, pleomorfisme, laju mitosis dan nilai histologis tetapi berkorelasi negative dengan imunoekspresi Bcl-2 (Düzcü et al., 2015).



J. PATOMEKANISME HIPOKSIA PADA PROLIFERASI SEL NEOPLASMA

Mekanisme terjadinya proses hipoksia pada sel/jaringan yang sedang mengalami proliferasi abnormal disebabkan oleh insufisiensi perfusi darah ke sel/ jaringan tersebut, sehingga proses difusi oksigen pada sel/jaringan terbatas dan terjadi hipoksia anemik. Kekurangan oksigen atau hipoksia pada jaringan ini akan mengganggu proses metabolisme glukosa dan adaptasi seluler.

Pada jaringan tumor sering terjadi gangguan perfusi sehingga tingkat oksigenasi sel/jaringan yang berbeda atau bervariasi. Hal ini disebabkan oleh kelainan struktur dan fungsional vaskuler yang berat pada jaringan tumor, dimana sifat dinding vaskulanya lebih permeabel karena lapisan sel otot polos yang kurang optimal disertai lapisan sel endotel dan membran basalis pada dinding lumen yang irregular. Bentuk abnormal pembuluh darah pada jaringan tumor ini akan menyebabkan resistensi jaringan, sehingga akan mengganggu aliran darah yang akan menyebabkan hipoksia iskemik. Jenis hipoksia ini juga disebut sebagai hypoxia akuta. Transportasi oksigen yang terkandung dalam darah ke dalam sel/ jaringan tumor akan mengalami gangguan pada saat proses difusi jaringan dari pembuluh darah (Hayashi et al., 2019; Y. Te Lin & Wu, 2020).



Sel-sel tumor yang terletak lebih perifer akan mendapatkan pasokan aliran darah yang lebih sedikit sehingga lebih berisiko terjadi hipoksia. Hipoksia anemia dapat terjadi pada tumor atau terapi-diinduksi. Tumor yang memiliki tingkat perfusi rendah sangat rentan terhadap hipoksia anemia. Jaringan normal dapat mengimbangi iskemia dengan meningkatkan jumlah oksigen yang diambil dari darah dan dapat menangkal anemia dengan mempercepat laju aliran darah lokal. Namun, tumor tidak mampu mengatur kadar oksigen yang semakin berkurang, yang mengarah ke perkembangan hipoksia (Hayashi et al., 2019; Y. Te Lin & Wu, 2020).

Tingkat angiogenesis pada tumor yang solid tidak seimbang jika dibandingkan dengan tingkat proliferasi yang lebih cepat sedangkan proses proliferasi sel sangat membutuhkan energi atau oksigen yang cukup. Hal ini berakibat neovaskularisasi yang terjadi tidak akan cukup mensuplai kebutuhan energy atau kadar oksigen melalui aliran darah sehingga distribusi oksigen atau nutrisi tidak seimbang. Bahkan ketidakseimbangan antara pasokan oksigen nutrisi dengan kebutuhan sel/jaringan yang sedang proliferasi sel itu masih akan tetap terjadi walaupun aliran darah normal dalam keadaan normal sekalipun. Hal ini



disebabkan karena penambahan populasi sel itu jauh lebih cepat. (Zhu et al., 2020).

Pada kondisi hipoksia, juga akan menyebabkan gangguan proses glikolisis, yang dikenal sebagai *Warburg Effect*, dimana di saat kadar oksigen lebih rendah (hipoksia) dimana sel-sel itu lebih adaptif melalui proses glikolisis yang bersifat anaerob daripada melalui siklus asam sitrat (fosforilasi oksidatif) untuk menghasilkan ATP di saat kadar oksigen rendah (Nurbubu, 2020). Pada saat kondisi hipoksia di lingkungan mikro jaringan/sel protein faktor transkripsi akan diaktifkan yang dikenal sebagai *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) dimana terdiri dari subunit HIF-1 β dan HIF-1 α sebagai respon adaptasi sel-sel tumor (Iommarini et al., 2017; Liu et al., 2015; Q. Zhang et al., 2021).

1) Dampak hipoksia

Ada beberapa dampak Hipoksia pada kanker payudara yang menginduksi HIF-1

- a. Hipoksia KPD sangat berhubungan dengan peningkatan risiko metastasis dan mortalitas pasien. Protein Transkripsi Faktor HIF-1 akan memediasi gen yang mengkode protein yang menginisiasi vaskularisasi dan pertumbuhan tumor primer, perekrutan sel stroma, remodeling matriks ekstraseluler, motilitas sel, invasi jaringan lokal atau



metastase (Cho et al., 2019), dan pemeliharaan fenotip sel induk karsinoma yang diperlukan untuk menghasilkan tumor sekunder (Q. Zhang et al., 2021).

- b. Studi praklinis terbaru menunjukkan bahwa kombinasi sitotoksik kemoterapi dengan obat-obatan yang menghambat faktor-faktor yang diinduksi hipoksia dapat meningkatkan hasil bagi wanita dengan KPD triple-negative. Sel-sel tumor di daerah hipoksia ini mulai beradaptasi dengan kondisi tekanan oksigen rendah (hipoksia) dengan mengaktifkan beberapa jalur bertahan hidup. Aktivasi faktor transkripsi HIF-1 adalah jalur yang paling dikenal untuk beradaptasi bagi sel-sel hipoksia dalam lingkungan mikro yang solid (Semenza, 2016).

2) Lingkungan Mikro Intratumoral arsinoma Payudara

Tiga proses umum pada karsinoma yang merupakan pathogenesis utama yaitu inisiasi dan perkembangan kanker. **Pertama**, mutasi somatik tertentu menyebabkan hilangnya fungsi *tumor suppressor* (penekan tumor) dan peningkatan fungsi *oncogen* (onkoprotein); **Kedua**, perubahan epigenetik mengubah pola ekspresi gen; dan **Ketiga**, perubahan dalam lingkungan mikro intratumoral menyebabkan perubahan luas pada gen ekspresi. Kadar Oksigen intrasel dan ekstrasel yang sangat menurun juga sering terjadi pada saat pertumbuhan



massa tumor, yang lebih sering ditemukan pada tumor yang solid. Pada keadaan hipoksia tumor yang solid sering menyebabkan proliferasi, invasi, metastasis dan prognosis yang buruk serta membentuk pertumbuhan massa tumor yang semakin solid. Proses demikian menyebabkan penyumbatan lumen pembuluh darah/ kompresi darah intrakompartemen lumen vaskuler sehingga mudah mengakibatkan gangguan aliran darah yang menyebabkan terjadinya insufisiensi pasokan oksigen jaringan tumor terutama di bagian sentral massa tumor (Semenza, 2013).

Komponen utama dari lingkungan mikro tumor (TME) adalah pembuluh darah, pembuluh limfatik, fibroblas, sel imun dan komponen kimia-fisik seperti matriks ekstraseluler (ECM) yang secara fungsional terjadi interaksi fisik antara unsur TME, ECM dengan kanker. Interaksi sel-sel kanker dengan ECM dan TME ini menentukan perkembangan massa tumor dan juga berpengaruh pada tampilan klinis. Tumor solid memiliki daerah yang secara permanen atau sementara mengalami kejadian hipoksia yang disebabkan oleh struktur vascular daerah massa tumor yang abnormal / menyimpang dan suplai aliran darah yang buruk (Y. Te Lin & Wu, 2020).

Respon adaptasi terhadap hipoksia jaringan tumor yang berupa timbulnya HIF-1 dapat menginisiasi terjadinya proses adaptasi dan penyesuaian diri dari sel kanker dan stroma yang



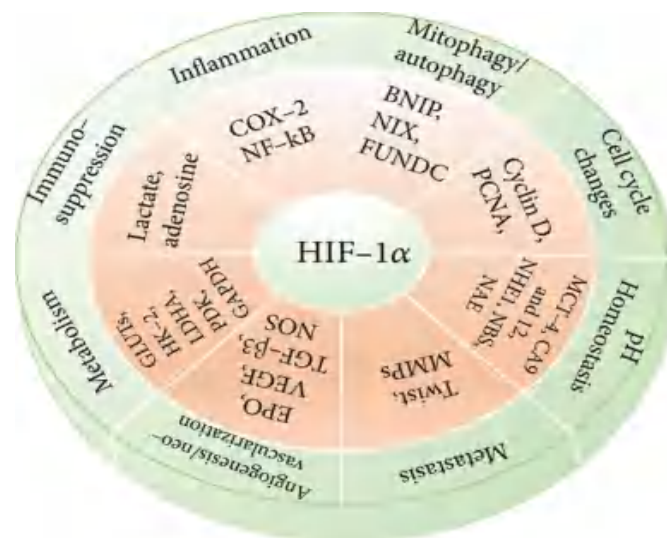
sesuai dengan kondisi di sekitarnya, sehingga mendorong perubahan yang menguntungkan perkembangan kanker. Tumor yang tumbuh cepat menyebabkan berkurangnya pasokan oksigen dari kanker dan sel-sel stroma tumor yang jauh dari pembuluh darah.

Pada keadaan hipoksia, terjadi perubahan metabolisme intrasel dari sel-sel tumor yang beralih ke metabolisme glikolisis anaerob, yang akan mengakibatkan pembentukan asam laktat dan meningkatkan proses pengasaman lingkungan mikro intratumoral. Lingkungan dimanfaatkan sel kanker untuk meningkatkan pertumbuhan tumor dan menyebabkan keterlibatan dari berbagai jenis sel imun, yang berasal dari perekrutan sel-sel imun sistemik. Adanya mediator sitokin yang diproduksi sel tumor dan sel stroma untuk memberikan pensinyalan yang memicu transformasi fibroblas menjadi "*Cancer Associated Fibroblast*" (CAF). Dalam keadaan hipoksia, sel kanker dan CAF akan menghasilkan *Extra Cellular Matrix* (ECM) yang kaku dan selaras dan mendukung terjadinya migrasi sel (Nalwoga et al., 2016).

Jadi lingkungan mikro intratumoral terbagi atas dua bagian: lingkungan mikro kimia dan lingkungan mikroseluler. Lingkungan mikrokimia meliputi pH, PO₂ dan konsentrasi molekul kecil lainnya (misalkan NO) dan metabolit (misalkan



glukosa, glutamin, laktat). Sedangkan lingkungan mikro seluler, meliputi sel-sel tumor, sel stroma, dan matriks ekstraseluler (ECM) yang dihasilkan oleh sel-sel stroma. Di antara jenis sel stroma adalah sel endotel vaskular (EC) dan pericytes, sel ekstraseluler limfatik, fibroblast, myofibroblast dan berbagai sel yang berasal dari sumsum tulang seperti makrofag, neutrofil, sel mast, sel penekan turunan myeloid (MDSC), dan sel batang mesenchymal (MSCs). Banyak sel-sel stroma direkrut ke tumor primer yang membantu pertumbuhan tumor primer atau metastasis (Semenza, 2013).



Gambar 11: Gen terkait HIF-1 α dan perannya dalam hipoksia mekanisme adaptif. HIF-1 α mengatur fisiologi kanker dan gen yang terkait.

Berkaitan dengan patogenesis diatas maka kondisi utama dari lingkungan mikro kimia pada tumor solid akan menyebabkan berkurangnya ketersediaan kadar O_2 intra jaringan tumor (hipoksia) dan hal ini memberikan efek besar pada lingkungan mikro seluler intratumoral yang berakibat pada proses



angiogenesis dan metastasis perkembangan karsinoma yang cepat, invasif dan metastasis massa tumor yang mengarah resiko kematian pasien. (Semenza, 2016).

1) Hipoksia pada jenis proliferasi sel yang membentuk pola solid

Menurut salah satu penelitian klinis menunjukkan bahwa kadar PO₂ intratumoral in situ yang diukur dengan menggunakan mikroelektroda *Eppendorf*, menghasilkan tekanan median 65 mmHg (dengan semua pengukuran >10 mmHg) pada jaringan payudara normal; sebaliknya, meta-analisis pada 10 penelitian yang melibatkan lebih dari 200 pasien mengungkapkan bahwa median PO₂ pada KPD sebelum dilakukan terapi adalah <10 mmHg.(Rani *et al.*, 2022a).

Hasil yang sangat mirip diperoleh dalam studi meta-analisis yang melibatkan lebih dari 700 pasien karsinoma serviks dan lebih dari 500 pasien kanker kepala dan leher (*head and neck tumor*) menunjukkan adanya hubungan antara PO₂ intratumoral <10 mmHg dan penurunan kelangsungan hidup bebas penyakit(Rani *et al.*, 2022b). Komponen utama dari lingkungan mikro intratumoral terdiri dari *cellular associated fibroblasts* (CAFs) sebagai komponen mayor (80%), pembuluh darah, pembuluh limfatik, sel imun dan komponen kimia-fisik seperti matriks ekstraseluler (ECM). Secara fungsional adanya interaksi fisik elemen-elemen ini dengan sel epitel karsinoma akan menentukan hasil klinis. Selama perjalanan progresi tumor,



pasokan aliran darah untuk kebutuhan nutrisi dan oksigen sel karsinoma dan sel stroma akan sering terjadi kekurangan/penurunan dimana kejadian ini lebih mudah ditemukan pada massa tumor solid dan lebih berisiko terjadi secara permanen. Pada kondisi hipoksia, sel-sel tumor akan berespon dengan menghasilkan *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) (Semenza, 2013). Gen HIF-1 akan mengaktifkan gen-gen lain yang terlibat dalam proses intraseluler pada proses-proses angiogenesis, invasi dan *Epithelial Mesenkimal Transition* (EMT). EMT adalah proses biologis di mana sel epitel non-motil berubah menjadi fenotip mesenkim dengan memiliki kapasitas invasif. Proses EMT telah terbukti terlibat pada banyak proses biologis termasuk embriogenesis, fibrosis, perkembangan tumor dan metastasis. Ciri khas EMT adalah hilangnya penanda permukaan epitel, terutama E-cadherin, dan perolehan penanda mesenkim termasuk vimentin dan N-cadherin. Penurunan regulasi E-cadherin selama EMT dapat dimediasi oleh represi transkripsi melalui pengikatan faktor transkripsi EMT (EMT-TFs) seperti SNAIL, SLUG dan TWIST ke E-box yang ada di promotor E-cadherin. Selain itu, EMT-TF juga bekerja sama dengan beberapa enzim untuk menekan ekspresi E-cadherin dan mengatur EMT pada tingkat epigenetik dan tingkat pascatranslasi. Secara mekanis, hipoksia terbukti mempengaruhi perilaku invasif dan migrasi sel kanker melalui EMT, trans-



differentiasi sel untuk memperoleh fleksibilitas dan kemampuan seluler, sebuah proses yang mengubah ekspresi gen mereka sebelum migrasi. EMT aktif secara fisiologis selama embriogenesis dan regenerasi jaringan, serta serogenesis pada banyak jenis tumor padat dan keganasan hematologi. EMT yang diinduksi hipoksia ditandai dengan penurunan ekspresi gen terkait epitel, seperti sebagai E-cad, N-catenin dan peningkatan mesenchymal-like ekspresi gen, seperti N-cad, vimentin, SMA, dan CXCR4. EMT dipromosikan oleh master regulator TGF- β yang meningkat akibat hipoksia sehingga mengaktifkan downstream factor transkription seperti Smads, Snail, Slug, dan Twist yang menghambat ekspresi E-cad (Y. Te Lin & Wu, 2020; Serrano-Gomez et al., 2016).

K. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) pada KPD

Struktur HIF-1

HIF-1 terdiri atas dua subunit HIF-1 yaitu HIF-1 α dan HIF-1 β . HIF-1 adalah protei berbasis basic-helix-loop-helix yang mengandung domain PAS. Keberadaannya ditemukan pada protein Drosophila Per and Sim dan pada *arylhydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) mamalia dan protein AHR.

Struktur HIF-1 α paling dekat dengan Sim. HIF-1 β (gen ARNT), akan mengalami heterodimerisasi dengan HIF-1 α atau AHR. mRNA dan Terjadinya induksi protein mRNA HIF-1 α dan HIF-1 β (ARNT)



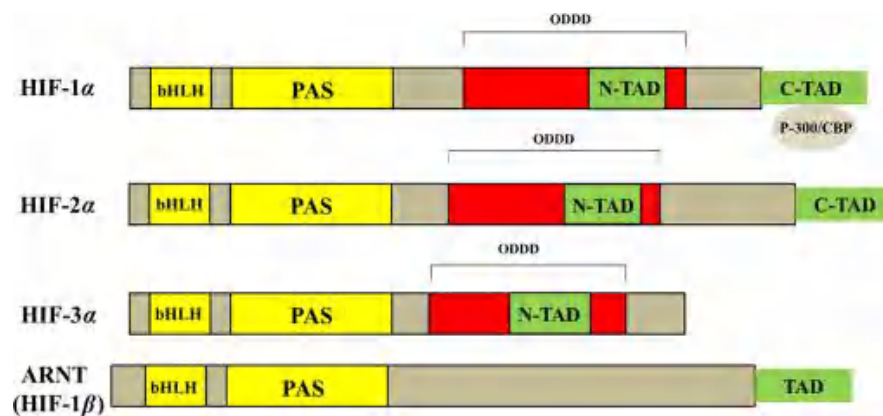
dalam sel yang hipoksia (terpapar oksigen 1%) akan hancur terdegradasi dengan cepat jika oksigen intrasel kembali menjadi 20%. Jadi HIF-1 berperan sebagai mediator transkripsi yang berespon terhadap hipoksia. (Hayashi et al., 2019) (Wang et al., 1995). Struktur HIF-1 terdiri atas 3 subunit yang sensitif terhadap oksigen, yaitu HIF-1 α , HIF-2 α dan HIF-3 α kemudian subunit konstitutif HIF-1 β , HIF-2 β , dan HIF-3 β . Disertai subunit domain helix-loop-helix (bHLH) dan basis PER-ARNT-SIM homology (PAS) yang memediasi heterodimerisasi dan membentuk kompleks aktif transkripsi HIF-1 α - HIF-1 β . Subunit HIF-1 β adalah anggota dari keluarga *aryl nuclear translocator* (ARNT) yang juga dikenal sebagai ARNT1, ARNT2, atau ARNT3, masing-masing HIF-1 adalah isoform yang paling sering diekspresikan, sedangkan HIF-2 diekspresikan terutama di jantung, paru-paru, ginjal dan plasenta. Sedikit yang diketahui tentang HIF-3, yang diekspresikan terutama oleh sel-sel epitel di paru-paru dan ginjal.

Faktor transkripsi HIF-1 bertindak sebagai pengatur transkripsi gen dengan promotor dan penambah yang mengandung elemen respons hipoksia berurutan (HREs). Stabilisasi HIF yang bergantung pada oksigen diatur oleh *enzim prolil hidroksilase* domain (PHD1, PHD2 dan PHD3) serta oleh *enzim asparaginil hidroksilase* FIH (*Faktor Inhibitor-HIF*). Enzim PHD dan FIH merupakan sensor terhadap kadar oksigen yang aktivitas



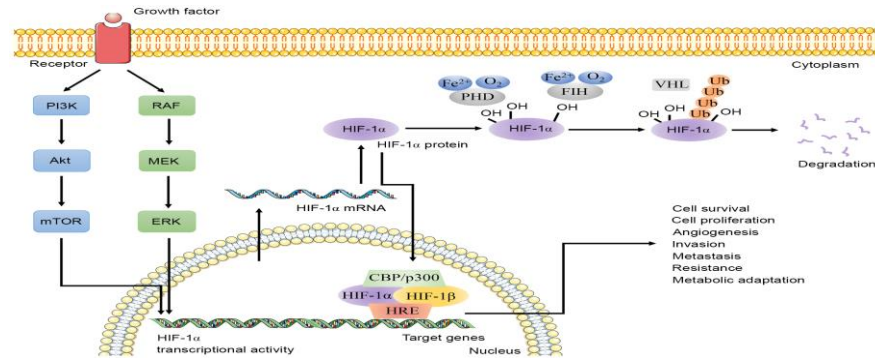
enzimatiknya tergantung perubahan kadar oksigen (Corrado & Fontana, 2020; Semenza, 2013; Q. Zhang et al., 2021).

Pada kondisi normoksia, HIF-1 akan mengalami ubiquitinasi dengan komponen penanda kompleks E ligase pVHL (gen *tumor suppressor Von Hippel Lindau*) yang selanjutnya akan didegradasi oleh proteasome (David & Michael, 2001; Iliopoulos et al., 1996; C. Lin et al., 2004; Masoud & Li, 2015)



Gambar 22. Struktur HIF-1





Gambar 13. Skema HIF-1 dan HIF 1 β Saat hipoksia, jalur-jalur PI3K/Akt/mTOR dan jalur MAPK (RAF/MEK/ERK) mengatur aktivitas transkripsi HIF 1 α .
 Sumber: molecular medicine reports 23: 17, 2021

L. Mencit Sebagai Hewan Percobaan/Penelitian

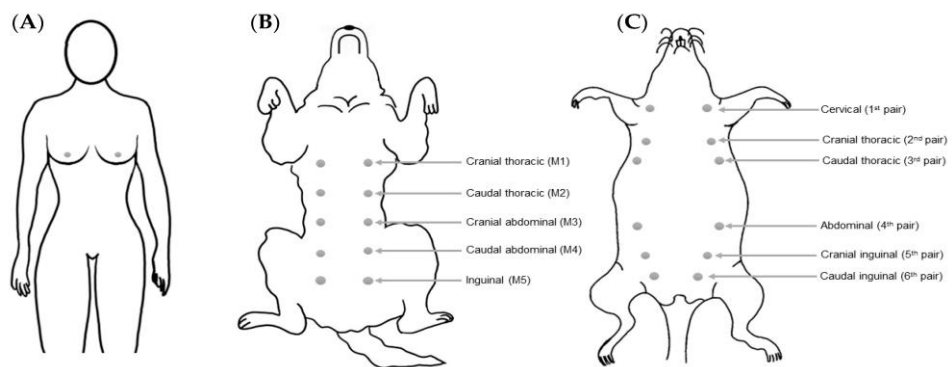
Mencit merupakan salah satu hewan mamalia yang cukup sering dijadikan sebagai hewan percobaan. Menurut Priyambodo (2003), mencit digolongkan ke dalam kingdom animalia dan phylum chordata. Mencit termasuk kedalam subphylum vertebrata dan kelas mamalia karena memiliki tulang belakang dan menyusui. Selanjutnya, mencit merupakan hewan dengan kemampuan mengerat sehingga termasuk ordo rodentia dengan familia muridae, nama genus Mus dan nama spesies Mus Musculus. Hewan jenis ini termasuk hewan crepuscular yang aktif pada senja dan malam hari (Priyambodo, 2003; Nugroho, 2018).

Mencit yang sering digunakan di laboratorium penelitian. Dibandingkan dengan hewan non-mamalia, mamalia lebih mirip dengan manusia. Hewan pengerat, terutama tikus dan tikus, adalah hewan paling populer untuk penelitian kanker payudara. Selain itu,

tikus pohon semakin banyak digunakan karena hubungan evolusionernya yang lebih dekat dengan primata daripada hewan



pengerat. Namun, kerugian menggunakan mamalia untuk penelitian kanker payudara termasuk periode percobaan yang panjang dan biaya tinggi. Mencit atau tikus mirip dengan manusia dalam hal anatomi, fisiologi, dan genetika. Selain itu, ada banyak strain tikus inbrida yang tersedia.(Ferreira *et al.*, 2023) (Zeng, Li and Chen, 2020)(Miller *et al.*, 2022).



Gambar 14. Skema distribusi anatomi payudara pada wanita (A), anjing betina (B) dan mencit.

Kelenjar mamme mencit betina, serupa dengan manusia, memiliki struktur tubuloalveolar yang tertanam dalam jaringan fibrovaskular dan adiposa yang dimulai dari alveoli sekretorik dan bermuara ke duktus intralobular, kemudian ke duktus ekstralobular, dan akhirnya ke duktus laktiferus besar yang berakhir di sinus laktiferus, yang berlanjut ke sinus puting susu dan bermuara ke permukaan puting susu melalui saluran papiler. Masing-masing saluran ini membentuk lobus kelenjar susu dan bertindak sebagai unit fungsional kelenjar puting susu. Puting susu di setiap kompleks payudara berbentuk kerucut, dan agak lebih tipis di arah lateral, tetapi bentuknya bervariasi antar ras. Rambut pada kulit di sekitar kelenjar susu

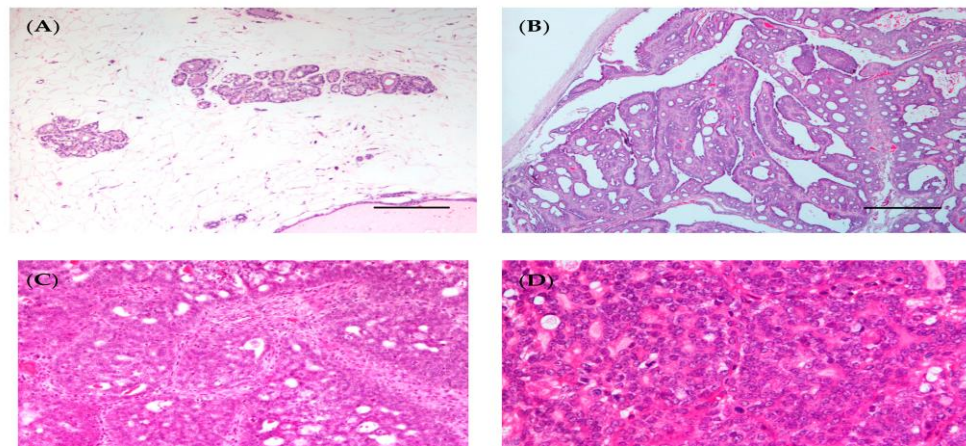


kurang padat, dan bagian luar puting susu ditutupi oleh epidermis yang sedikit lebih tebal dibandingkan epidermis kulit di sekitarnya. Saluran terminal ekstralobular yang lebih besar (saluran laktiferus) terdiri dari lapisan ganda sel epitel luminal yang dilapisi oleh sel mioepitel. Saluran ekstralobular dan intralobular distal yang lebih kecil dilapisi oleh satu lapisan sel epitel luminal dengan lapisan luar sel mioepitel. Mirip dengan wanita, alveoli sekretorik—yang berkembang setelah stimulasi hormonal—terdiri dari lapisan dalam sel epitel luminal, dengan beberapa tetesan lipid intracytoplasma, dikelilingi oleh lapisan luar sel mioepitel, yang kemudian dikelilingi oleh membran basal. Seperti pada wanita, prolaktin merangsang kelenjar untuk memproduksi susu, dan oksitosin memungkinkan susu dikeluarkan ke dalam saluran. Saat lahir, hanya saluran besar yang terbentuk. Seperti pada wanita, perkembangan payudara pada anjing hanya dimulai saat pubertas, saat ovarium mulai melepaskan estrogen. Proliferasi sel terjadi di ujung terminal saluran untuk membentuk asinus berbentuk lobul. Selama kehamilan, saluran berkembang dan menimbulkan lobulus dan alveoli (unit lobuloalveolar) karena tingginya kadar progesteron. Prolaktin bekerja pada sel alveolar presekresi yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel alveolar sekretorik. Saat melahirkan, kelenjar susu dapat digambarkan sebagai struktur duktal-lobular-alveolar sekretorik.

regresi alveolar dimulai 10 hari pascapersalinan, dan selesai setelah sekitar 40 hari. Secara histologis, kelenjar susu mencit betina



memiliki morfologi sama dengan manusia yaitu tubuloalveolar yang terdiri dari sistem saluran yang bercabang-cabang dan asinus-asinus terminal yang tersusun dalam lobulus, mirip dengan yang dijelaskan pada wanita dan anjing betina. Setiap kelenjar susu memiliki satu saluran laktiferus yang mengalirkan susu ke puting, berbeda dengan apa yang dijelaskan pada manusia dan anjing, yang memiliki banyak saluran laktiferus (masing-masing 10–25 dan 7–16).



Gambar 15. Mikroskopik dari preparat dengan pewarnaan hematoxilin eosin, tampak kelenjar susu tikus. (A) kelenjar susu normal; (B) karsinoma papiler intraduktal (C) karsinoma kribriiform invasif; (D) karsinoma invasif.

Saluran laktiferus tikus terdiri dari 5-10 saluran pengumpul sekunder.

Saluran dan lobulusnya mirip dengan saluran dan lobulus betina dan anjing betina, dan tertanam di jaringan adiposa, yang disebut bantalan lemak susu. Sel luminal dan mioepitel memiliki fungsi yang sama dan distimulasi oleh hormon yang sama, masing-masing prolaktin dan oksitosin [49]. Jumlah lobul-lobul asinus mencapai

aksimum pada umur 20 hari. Selama kehamilan, ada peningkatan



epitel, dengan pertumbuhan lobulus dan saluran. Prolaktin adalah hormon yang bertanggung jawab untuk alveologensis.

Mencit memiliki strain keturunan dari *Mus domesticus* atau yang dikenal sebagai European house mouse. Adapun beberapa strain dari mencit yang digunakan sebagai hewan uji coba laboratorium diantaranya strain swiss webster yang sebagian besarnya berwarna putih albino dan merupakan strain yang paling umum digunakan untuk berbagai penelitian, strain A/jak, strain Balb/C7 yang biasa digunakan dalam penelitian terkait produksi plasmacytomas untuk antibody monoclonal, strain Bab b/c, strain C3H yang memiliki angka tumor mammae yang tinggi, strain GRS/Ajs (GR) yang paling baik digunakan dalam meneliti berbagai jenis tumor kelenjar susu. Selain itu, terdapat strain A/J yang banyak dipakai dalam penelitian terkait imunologi dan kanker serta strain C57BL/6 yang biasanya digunakan dalam penelitian genetik. Nomenklatur dari genetic mencit sendiri telah tertulis dengan jelas di panduan yang dibuat oleh International Committee on Standardized Genetic nomenclature for Mice yaitu Guideline for Nomenclature of Mouse and Rat Strain (Nugroho, 2018).

Beberapa kelebihan yang dimiliki mencit sebagai hewan uji laboratorium yaitu jumlah anak yang banyak setiap kelahiran, siklus hidup yang cenderung pendek dimana hidup mencit berkisar umur 1-3 tahun, sifat-sifat yang dimiliki sangat bervariasi, dapat ditangani dengan mudah. Selain itu, mencit memiliki sifat dan ciri reproduksi



yang tidak jauh berbeda dengan mamalia lainnya seperti domba, sapi dan kambing (Nugroho, 2018). Selanjutnya, mencit adalah hewan mamalia yang memiliki karakteristik fisiologis, anatomi dan biokimia yang mirip seperti manusia, termasuk sisem reproduksi, peredaran darah dan sistem pernapasan dimana hal tersebut menjadi salah satu alasan pemilihan mencit sebagai hewan uji coba.(Ferreira *et al.*, 2023) (Wibowo *et al.*, 2010) (Ngatidjan dan Hakim, 2006).

Mencit jantan lebih aktif dalam beraktivitas, memiliki sedikit atau hampir tidak ada hormon estrogen sehingga secara hormonal lebih stabil dibandingkan mencit betina. Sedangkan, mencit betina cenderung memiliki tingkat stress yang lebih dibandingkan mencit jantan.(Legorreta-Herrera *et al.*,2018; Ariyanti *et al.*, 2007).

Dalam penggunaan mencit sebagai hewan uji coba untuk penelitian, pemeliharaan dan manajemen sehari-hari hewan tersebut sangat penting untuk diperhatikan. Kandang mencit dapat menggunakan kotak dengan ukuran sekitar 40cm x 30 cm x 18 cm dimana dengan ukuran tersebut cukup untuk 5-7 ekor mencit. Prinsip pemilihan kandang mencit yang baik ialah kandang yang dapat dibersihkan dan disteril dengan mudah, memiliki daya tahan lama dan kuat dari keratan mencit. Bahan kandang yang dianjurkan diantaranya yaitu bahan plastik, bahan kaca (akuarium) dan

aluminium sedangkan bahan PVC bersifat mudah dikerat dan sulit disterilkan sehingga penggunaannya tidak dianjurkan. Selanjutnya,



dasar dari kandang harus menggunakan bahan yang mudah menyerap air, bebas kandungan senyawa berbahaya, serta harus rutin diganti terutama jika sudah basah dimana tanda alas kandang harus segera diganti diantaranya yaitu adanya bau ammoniak. Adapun bahan alas kandang yang disarankan yaitu sekam padi, sobekan kertas, serutan dan sisa gergaji kayu (Yusuf et al., 2022).

Hal penting lainnya terkait pemeliharaan dan manajemen yaitu makanan dimana menurut Hasanah (2009), makanan mencit mengandung 12% air, 8% serat, 10% protein dan 3% lemak. Makanan mencit seringkali dalam bentuk pelet dibandingkan tepung agar perubahan komposisi berkurang. Kebutuhan makan mencit dewasa normalnya dapat makan 3-5 gr setiap hari sedangkan kebutuhan minum mencit biasanya sekitar 15-30 mL air setiap hari. Namun, kebutuhan makan akan lebih banyak untuk mencit yang hamil atau sedang dalam masa menyusui. Penentuan kebutuhan makanan mencit cenderung lebih mempertimbangkan bobot tubuhnya dimana kebutuhan makanan mencit sekitar 10% dari bobot tubuh setiap hari. Perlu diperhatikan bahwa makanan yang diberikan berlebihan dan tidak sesuai dapat menyebabkan berbagai jenis penyakit. Untuk penambahan berat badan mencit normalnya 1 gram per hari dimana berat badan mencit jantan pada usia 4 minggu yaitu sekitar 18-20 gr sedangkan untuk jantan dewasa sekitar 20-40 gr

dan betina dewasa sekitar 18-35 gr. (Yusuf et al., 2022). Selanjutnya, praktik penggunaan mencit sebagai hewan uji coba harus



memperhatikan standar etika hewan sehingga informasi terkait teknik pemeliharaan, pemberian sediaan (simplisia), teknik pengambilan dan perhitungan darah serta teknik anestesi dan pembedahan harus diketahui dan dipelajari dengan baik dan benar agar tidak menyebabkan penderitaan pada hewan mencit sebagai hewan uji coba penelitian (Nugroho, 2018)



DMBA (7,12-dimethylbenz(a)-antrasena) merupakan zat karsinogenik sebagai polutan lingkungan yang kuat dan mudah ditemukan di udara bebas pada asap bekas kendaraan bermotor, asap pabrik, asap rokok dan lain-lain. Zat DMBA ini dapat menginduksi sel normal sehingga mengalami mutasi gen selain menimbulkan 'reactive oxygen species'(ROS) meningkat. Mutagen DNA ini akan menjadi protoonkogen ini akan menimbulkan respon proliferasi sel tidak terkendali dan dapat menjadi kanker. Beberapa kanker yang banyak diketahui dapat terinduksi menjadi kanker tersebut adalah payudara, kulit, paru-paru dan mulut.

Efek zat karsinogenik DMBA diawali oleh proses reduksi enzimatik dari kelompok nitro yang menghasilkan ROS. Produksi ROS yang berlebihan ini dapat mengakibatkan stress oksidatif dan disfungsi seluler yang mengarah pada tahap inisiasi neoplasma (Barros et al., 2004; Wibowo et al., 2010). Stress oksidatif dipengaruhi oleh ketidakseimbangan antara antioksidan dan produksi radikal bebas seperti anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^-) yang menyebabkan kerusakan oksidatif dan cedera jaringan (Rajakumar et al., 2018). ROS berlebihan berkaitan erat dengan gangguan fungsi makromolekul seluler seperti lipid, protein, dan DNA; yang selanjutnya dapat mengubah sifat membran intrinsik seperti fluiditas, transportasi ion, hilangnya aktivitas enzim, penghambatan sintesis protein dan pembentukan *DNA adduct* yang mendorong mutagenesis dan transformasi yang menyebabkan proliferasi

terkontrol pada sel-sel epitel maupun non epitel di payudara, kulit, prostat dan lain-lain. (Machida & Imai, 2021).



Proliferasi sel-sel yang tidak terkontrol cenderung menyebabkan tingkat kepadatan sel semakin meningkat dan akan menimbulkan kondisi hipoksia. Pada kondisi demikian akan menghasilkan respon dari sel berupa faktor transkripsi HIF-1 yang berlebihan pada saat kondisi hipoksia sel tumor atau juga dapat terbentuk dalam jumlah kecil pada keadaan kadar oksigen sel normal (normoksia). Faktor HIF-1 membentuk kompleks heterodimerik yang terdiri dari subunit HIF-1 dan subunit HIF-1 β (ARNT) yang stabil. Kedua subunit ini secara bersamaan mengikat *Hypoxia Respons Elements* (Hypoksia elemen respon; HRE) ke ratusan gen yang memfasilitasi adaptasi terhadap hipoksia, khususnya elemen promotor dari ekspresi Gen VEGF di wilayah promotor VEGF. HIF-1 adalah subunit yang memberikan respon terhadap terhadap kondisi kadar oksigen intrasel/jaringan.

Jika kadar oksigen normal maka HIF-1 akan dipertahankan pada tingkat rendah dan segera bergabung dengan enzim pVHL yang selanjutnya mengalami ubiquitinisasi untuk didegradasi oleh proteasome. Tetapi dalam kondisi hipoksia, pVHL mengikat *oksida nitrat* (NO) dan tidak mengikat HIF-1 yang akibatnya HIF-1 bebas yang memungkinkan HIF-1 akan bermigrasi / translokasi dari sitoplasma ke nucleus sel. Saat dalam nucleus sel, HIF-1 mengalami heterodimerisasi dengan HIF-1 β (ARNT) yang selanjutnya dengan bantuan protein CBP dan p300, HIF-1 menginduksi ekspresi VEGF. VEGF dan reseptornya adalah jalur

jalur yang terkonfirmasi dalam angiogenesis. VEGF merangsang proliferasi sel endotel, migrasi dan pembentukan pembuluh kapiler.



Pertumbuhan tumor melalui angiogenesis berkorelasi langsung dengan ekspresi VEGF pada kanker payudara (Adams et al., 2000; De Francesco et al., 2013).

Proliferasi sel jaringan tumor yang tumbuh sebagai akibat pengaruh angiogenesis yang dipengaruhi oleh VEGF dan HIF-1 dapat terlihat dari peningkatan kadar protein Ki67 sebagai protein yang mencerminkan terjadinya peningkatan daya proliferasi sel pada kondisi yang tidak terkontrol. Pada keadaan demikian akan tampak secara mikroskopik gambaran proliferasi sel yang terjadi dan jika terjadi pembentuk tumor malignan maka dapat dinilai juga derajat diferensiasi, tipe histologi, dan stadium dari karsinoma payudara (Mannell, 2016).

Protein Ki-67 berperan dalam proses proliferasi dan pertumbuhan sel kanker dimana protein Ki-67 berperan dalam fase aktif siklus sel baik siklus G1, S, G2 dan mitosis yang pada akhirnya terbentuk sel sel tumor yang semakin banyak dan invasi ke dalam pembuluh darah. Beberapa biomarker yang sudah lebih dahulu dikenal untuk mendeteksi kanker payudara lebih dini, memantau perkembangan penyakit, atau berfungsi sebagai penanda pengganti prognosis dan prediksi penggunaan obat-obatan adalah pemeriksaan reseptor estrogen (ER), reseptor progesteron dan Ki-67. Jadi Ki-67 adalah penanda yang sangat baik untuk menentukan fraksi pertumbuhan populasi sel tumor (Mannell, 2016).



NOVELITAS

Penelitian terkait ekspresi hubungan ekspresi mRNA gen HIF-1, mRNA gen VEGF dan kadar Ki67 pada mencit Balb/c yang diinduksi DMBA disertai efek pemberian antiVEGF pada hewan model Balb/c dengan melihat perubahan molecular dan gambaran proliferasi sel secara histopatologi jaringan payudaranya belum pernah dilakukan dan belum ada penelitian serupa.



BAB IV
KERANGKA KONSEP

