

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Kanker payudara telah menjadi masalah kesehatan bagi wanita di seluruh dunia. Berdasarkan proyeksi data *Global Cancer Observatory 2022*, estimasi pertumbuhan insidensi dan mortalitas kanker payudara pada tahun 2025 telah menunjukkan peningkatan 38% dan 68%, secara berurutan (Fu *et al.*, 2025; Kim *et al.*, 2025). Sementara itu, kanker payudara di Indonesia menempati peringkat pertama keganasan dengan insidensi tertinggi yaitu 30,1% (Bray *et al.*, 2024). Selain beban terkait frekuensi penyakit yang tinggi, kanker payudara juga mendestruksi kualitas hidup banyak wanita dan dengan itu berkontribusi secara signifikan terhadap luaran psikososial yang buruk mencakup isolasi dan retraksi diri dari interaksi sosial (Rosenberg *et al.*, 2020; Hanson *et al.*, 2022). Tingginya insidensi, morbiditas, dan mortalitas yang disebabkan oleh kanker payudara menarik atensi global dan mengakomodasi berbagai strategi manajemen yang komprehensif dan inklusif untuk menekan frekuensi penyakit dan dampak biopsikososial yang diakibatkannya.

Meskipun strategi manajemen kanker payudara mencakup deteksi dini telah diberlakukan secara nasional melalui pedoman baku dan beberapa keputusan resmi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, namun cakupan penapisan kanker payudara masih berada pada angka 9,8% dari seluruh populasi wanita Indonesia (Wahidin *et al.*, 2022). Rendahnya penemuan dini kanker payudara berdampak pada pertambahan frekuensi kasus kanker payudara dengan stadium lanjut lokal

di berbagai negara berkembang (Dhanushkodi *et al.*, 2021; Benitez Fuentes *et al.*, 2024). Peningkatan insidensi kanker payudara stadium lanjut lokal ini telah menjadi tantangan karena partisipan yang diinklusi dalam uji klinis terkadang memenuhi kriteria yang tidak dapat dilakukan operasi (Dhanushkodi *et al.*, 2021). Hal inilah yang menjadikan rasionalisasi terhadap dilakukannya kemoterapi neoadjuvant pada pasien kanker payudara stadium lanjut lokal yang diteruskan dengan penilaian kembali untuk kelayakan manajemen operatif (Aebi, Karlsson and Wapnir, 2022; Malhotra and Tadros, 2024).

Pemberian kemoterapi neoadjuvant pada kasus kanker payudara stadium lanjut lokal bertujuan untuk mereduksi ukuran tumor sehingga dapat memungkinkan pembedahan definitif dengan margin operatif yang memiliki resektabilitas yang adekuat (Cruz-Ausejo *et al.*, 2023). Namun, utilisasi kemoterapi neoadjuvant saat ini telah bersifat ekstensif dan tidak terbatas hanya untuk konversi tumor payudara yang tidak dapat dioperasi menjadi dapat dioperasi (Golshan *et al.*, 2020; Cruz-Ausejo *et al.*, 2023). Penatalaksanaan kemoterapi adjuvant bahkan telah dilaporkan mampu meningkatkan angka *Breast Conserving Surgery* pada kanker payudara stadium lanjut lokal yang sebelumnya tidak dapat dioperasi dan juga berkontribusi dalam mereduksi probabilitas terjadinya mikrometastasis (Korde *et al.*, 2021). Meskipun terdapat banyak keuntungan kemoterapi neoadjuvant dari segi penatalaksanaan kanker payudara stadium lanjut lokal, namun respon individu terhadap kemoterapi ini masih sangat

bervariasi. Oleh karena itu, sampai saat ini, belum ada regimen kemoterapi baku yang dianjurkan.

RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) telah menjadi dasar kuantifikasi untuk menilai respon kemoterapi. Berdasarkan pedoman ini, respon terhadap kemoterapi dibagi menjadi respon sepenuhnya (*complete respons/CR*), respon sebagian (*partial respons/PR*), kanker progresif (*progressive disease/PD*), dan stabil (*stable respons/SR*). Kemoterapi neoadjuvant pada kanker payudara stadium lanjut lokal memberikan hasil luaran CR, PR, PD dan SR sebanyak 38,2%, 47,1%, 8,8%, dan 2,9%, secara berturut turut (Pandurangappa *et al.*, 2023). Namun, belum ada identifikasi terhadap faktor determinan yang mengakibatkan respon respon tersebut.

Investigasi terhadap determinan respon kemoterapi neoadjuvant masih menjadi fokus utama dalam upaya merekomendasikan regimen kemoterapi yang tepat. Seiring dengan perkembangan biologi kanker payudara, telah dilaporkan bahwa salah satu penentu respon tersebut adalah sub tipe molekuler dari kanker payudara itu sendiri (Von Minckwitz *et al.*, 2019; Spring *et al.*, 2020). Telah lama diketahui bahwa pasien dengan sub tipe *Triple-Negative Breast Cancer* (TNBC) dan HER2-positif lebih mungkin mencapai respon patologis yang baik dengan kemoterapi neoadjuvant (Loibl *et al.*, 2018; Korde *et al.*, 2021). Selain itu, suatu studi retrospektif baru baru ini melaporkan bahwa tipe histologis dan ekspresi reseptor faktor proliferasi lainnya turut berperan dalam memengaruhi respon klinis terhadap kemoterapi neoadjuvant, dan dengan itu mendorong

seluruh pihak untuk terus menginvestigasi biomarker yang mungkin berperan menginterferensikan respon tersebut (Yılmaz *et al.*, 2025). Kanker payudara stadium lanjut lokal memiliki heterogeneitas molekuler yang tinggi meskipun berada dalam satu subtipe molekuler tertentu, dan dengan ini mempengaruhi respon terhadap kemoterapi neoadjuvant (Lüönd, Tiede and Christofori, 2021). Hal ini mengkonstruksikan sebuah pemahaman bahwa penatalaksanaan kanker payudara harus lebih terpersonalisasi dan mengikuti karakteristik molekuler yang heterogen tersebut.

Beberapa sitokin telah diinvestigasi untuk menjadi biomarker terhadap progresifitas kanker payudara (Groysman *et al.*, 2021). Utilisasi sitokin sebagai biomarker prediktif terhadap respon kemoterapi pada individu dengan kanker payudara masih sangat terbatas. Namun, dewasa ini terdapat pemahaman bahwa derivat IL-1 yaitu IL-33 dihipotesiskan memiliki kemampuan untuk memprediksi respon kemoterapi. IL-33 memiliki peran penting dalam biologi kanker payudara dan mencakup hampir semua ciri utama kanker termasuk, perkembangan dan metastasis kanker, lingkungan mikro tumor dan metabolisme kanker (Stojanovic *et al.*, 2023). Kadar IL-33 dalam serum ditemukan meningkat secara signifikan pada pasien kanker payudara dibandingkan dengan kontrol sehat (Haghbin *et al.*, 2023). Ekspresi mRNA IL-33 dilaporkan meningkat utamanya pada kanker payudara dengan subtipe molekuler luminal A, luminal B, dan TNBC dibandingkan jaringan payudara sehat (Albuquerque *et al.*, 2023). Lebih lanjut lagi, subtipe molekuler luminal dengan stadium lanjut lokal ataupun metastatik memiliki ekspresi IL-33 yang superior dibandingkan subtipe dan

stadium lainnya. Sementara itu, peningkatan yang sama juga diamati pada individu yang tidak menjalani kemoterapi neoadjuvant. Dari temuan ini, Albuquerque et al menyimpulkan bahwa kemoterapi neoadjuvant secara potensial mampu menekan ekspresi mRNA IL-33. Menariknya, meskipun IL-33 umumnya bersifat pro-tumorigenik, perannya dalam terapi kanker masih kontroversial karena efek yang bertentangan dalam tumorigenesis dan respon anti-tumor (Yeoh, Vu and Krebs, 2022). Hal ini menunjukkan kompleksitas peran IL-33 yang perlu diinvestigasi lebih lanjut.

Terdapat beberapa limitasi dan kesenjangan penelitian sebelumnya dalam investigasi peran biologis IL-33 untuk menilai respon kemoterapi kanker payudara. Pertama, penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Albuquerque et al hanya mengamati ekspresi mRNA dari IL-33, sebagaimana prinsip dogma sentral biologi molekuler bahwa pengukuran ekspresi di tingkat transkriptomik tidak merepresentasikan seluruh dinamika molekuler suatu protein dan efeknya terhadap fenotipe sel karena banyak faktor yang akan mempengaruhi ekspresi proteomik IL-33 setelah transkripsi. Kedua, penelitian spesifik yang mengukur ekspresi mRNA IL-33 tersebut hanya mengakomodasi konklusi komparatif antara jaringan payudara sehat dan beberapa subtype molekuler serta jaringan kanker setelah kemoterapi neoadjuvant. Tidak ada temuan korelatif tentang akurasi prediktif ekspresi IL-33 sebelum kemoterapi terhadap respon setelah kemoterapi neoadjuvant. Ketiga, penelitian sebelumnya tidak melakukan standarisasi terhadap stadium kanker payudara pada saat

ekspresi mRNA IL-33 di-kuantifikasi sehingga konklusi yang dihasilkan bersifat heterogen dan sulit untuk digeneralisasi.

Berdasarkan penjabaran terkait besaran masalah kanker payudara stadium lanjut lokal, utilisasi kemoterapi neoadjuvant, strategi potensial untuk memprediksi respon kemoterapi, dan kesenjangan serta kontroversi yang muncul diantara penelitian penelitian sebelumnya, maka peneliti ingin mengajukan suatu upaya untuk menginvestigasi secara komprehensif potensi peran IL-33 dalam memprediksi respon kemoterapi neoadjuvant pada pasien kanker payudara stadium lanjut lokal. Peneliti memperhatikan beberapa limitasi utama yang telah dijabarkan sebelumnya dan mengakomodasi strategi untuk mengisi kesenjangan tersebut dengan beberapa cara yakni: (1) peneliti akan mengukur ekspresi IL-33 pada tingkat proteomik; (2) uji korelatif akan dilakukan dengan mengukur ekspresi IL-33 tersebut sebelum kemoterapi neoadjuvant dan mengkorelasikannya dengan kondisi klinis pasien setelah kemoterapi neoadjuvant yang dinilai berdasarkan pedoman RECIST; (3) peneliti hanya menginklusi pasien dengan kanker payudara stadium lanjut lokal; dan (4) analisis sub-kelompok akan dilakukan untuk menginvestigasi kemungkinan interferensi sub tipe molekuler, regimen kemoterapi, dan tipe histologis terhadap respon kemoterapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalisasi terapi terpersonalisasi dan presisi sebagai prinsip baru manajemen kanker payudara yang bertujuan untuk menurunkan morbiditas dan mortalitas yang selama ini telah menjadi beban epidemiologis yang signifikan diseluruh dunia

1.2. RUMUSAN MASALAH

1. Bagaimana profil ekspresi protein intraseluler IL-33 pada kanker payudara stadium lanjut lokal sebelum menjalani kemoterapi neoadjuvant?
2. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi protein intraseluler IL-33 yang dikuantifikasi terhadap respon klinis pasien kanker payudara stadium lanjut lokal yang telah menjalani kemoterapi neoadjuvant?
3. Seberapa besar peran prediktif ekspresi protein intraseluler IL-33 terhadap respon klinis pasien kanker payudara stadium lanjut lokal yang menjalani kemoterapi neoadjuvant?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum:

Menginvestigasi peran protein IL-33 pada kanker payudara stadium lanjut lokal yang telah menjalani kemoterapi neoadjuvant.

Tujuan khusus:

1. Mengetahui profil ekspresi protein intraseluler IL-33 pada kanker payudara stadium lanjut lokal.
2. Mengetahui hubungan antara ekspresi protein intraseluler IL-33 dan respon klinis pasien kanker payudara stadium lanjut lokal yang menjalani kemoterapi neoadjuvant.

3. Mengetahui peran prediktif ekspresi protein intraseluler IL-33 terhadap respon klinis pasien kanker payudara stadium lanjut lokal yang menjalani kemoterapi neoadjuvant

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan mampu mengisi kesenjangan dan membantu menjawab kontroversi terkait peran biologis IL-33 dalam progresifitas dan respon pengobatan kanker payudara stadium lanjut lokal. Strategi investigasi yang dicanangkan oleh peneliti berorientasi terhadap limitasi yang ada pada penelitian sebelumnya. Hal ini diharapkan mampu berkontribusi terhadap peningkatan pengetahuan terbaru terkait dasar empiris dalam menyusun terapi terpersonalisasi.

Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan berkontribusi terhadap ekstensifikasi pilihan pilihan penanda molekuler yang secara praktis dapat dijangkau. Utilisasi IL-33 sebagai penanda prediktif respon kemoterapi neoadjuvant pada kanker payudara stadium lanjut lokal memiliki keunggulan utama bahwa metode identifikasi dan quantifikasinya melibatkan pengambilan spesimen yang sangat mudah yakni jaringan tumor (walaupun dalam proses konstruksi data empirisnya memerlukan evaluasi genomik). Namun, terlepas dari kompleksitas investigasinya, jika IL-33 dapat diterima sebagai penanda prediktif, maka program manajemen kanker payudara terpersonalisasi sudah dapat melibatkan

fasilitas kesehatan primer dan dengan itu meningkatkan inklusivitas program dan mempercepat keputusan klinis yang presisi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

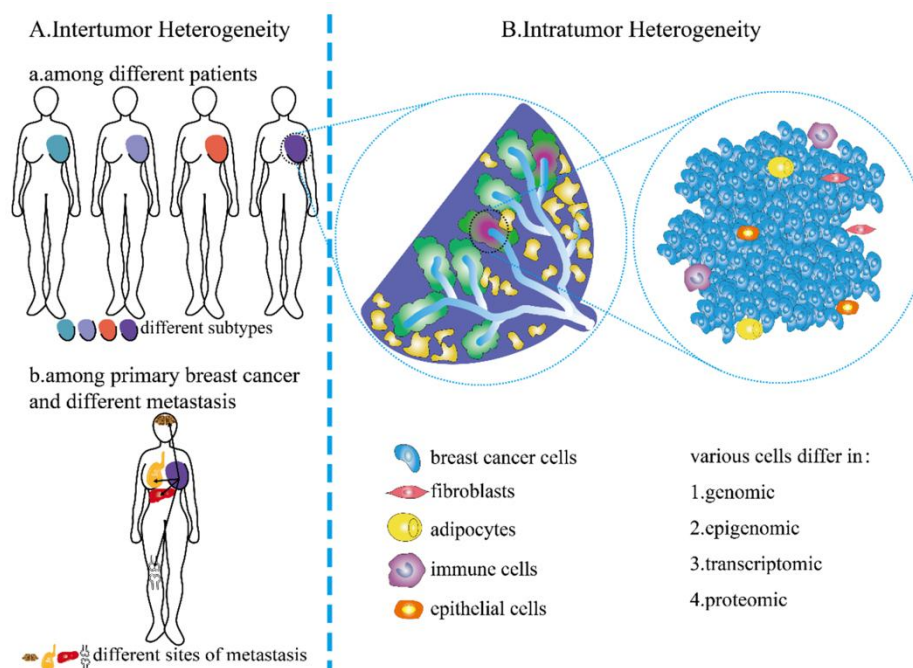
2.1. KANKER PAYUDARA

Kanker payudara telah menjadi fokus utama dunia karena angka insidensi, morbiditas, dan mortalitas yang tinggi (Bray *et al.*, 2024; Fu *et al.*, 2025). Kanker payudara merupakan keganasan dengan kompleksitas yang tinggi melibatkan tipe molekuler yang heterogen dan manifestasi klinis yang beragam pada tahap awal sehingga memungkinkan keterlambatan diagnosis dan penanganan (Lüönd, Tiede and Christofori, 2021). Beberapa aspek dari kanker payudara harus direkognisi secara mendalam dengan tujuan untuk mengetahui bagaimana kanker ini berprogresi, berinfiltrasi, dan bermetastasis. Peneliti melakukan tinjauan terhadap aspek terkait heterogeneitas molekuler, tampilan klinis, fenotipe biologis, dan utilisasi kemoterapi neoadjuvant untuk memberikan gambaran utuh terkait hal hal yang harus direkognisi sebagai upaya untuk menjawab pertanyaan penelitian yang telah diajukan.

2.1.1. Heterogeneitas Molekuler Kanker Payudara

Heterogenitas molekuler kanker payudara merupakan karakteristik penting yang mempengaruhi respon terhadap pengobatan dan resistensi agen anti-tumor. Heterogeneitas molekuler kanker payudara ditemukan baik secara intertumoral maupun intratumoral (Kuncman *et al.*, 2021; Gu, Xiao and Shao, 2024). Heterogeneitas intertumoral merujuk pada keragaman profil molekuler antar kelompok tumor diantara pasien

sedangkan heterogeneitas intratumoral merupakan keragaman molekuler yang dipresentasikan oleh setiap sel dalam satu kelompok jaringan kanker payudara (Guo *et al.*, 2023). Keragaman yang dimaksud dapat terjadi pada level genomik, transkriptomik, maupun proteomik. **Gambar 2.1.1** mengilustrasikan perbedaan mendasar antara heterogeneitas intertumoral dan intratumoral.



Gambar 2.1.1. Heterogeneitas pada Kanker Payudara dapat terjadi secara Intertumoral (A) dan Intratumoral (B). Heterogeneitas intertumoral dapat menunjukkan keragaman diantara pasien berbeda (a) atau keragaman antara profil molekuler sel kanker primer dan sel kanker metastasisnya (b). Sedangkan heterogeneitas intratumoral merujuk pada keragaman profil molekuler yang terjadi didalam jaringan tumor primer itu sendiri

Berbagai macam panduan klinis telah dipublikasi untuk mengakomodasi heterogeneitas molekuler kanker payudara ini dalam

kaitannya dengan rencana terapi (Cardoso *et al.*, 2024; Gradishar *et al.*, 2024; Loibl *et al.*, 2024). Pada semua panduan klinis yang telah digunakan, terdapat anjuran untuk melakukan pemeriksaan imunohistokimia pada semua pasien kanker payudara guna menentukan subtype molekuler yang didasari oleh heterogeneitas intertumoral. Klasifikasi molekuler dengan penanda imunohistokimia yang klasik mencakup *Estrogen Receptor* (ER), *Progesteron Receptor* (PR), dan *Human Epidermal Growth Receptor 2* (HER2) telah luas digunakan sebagai dasar menentukan heterogeneitas intertumoral tersebut dan dengan itu dimanfaatkan sebagai dasar untuk mengambil keputusan terkait rencana terapi yang akan dilakukan pada setiap pasien (Loibl *et al.*, 2024). Marker imunohistokimia yang lain dan cukup luas digunakan adalah Ki67. Antibodi monoklonal Ki-67 yang asli ditemukan mewarnai nukleolus selama fase G1, S dan G2 dari siklus sel tetapi tidak pada sel dalam fase G0. Temuan ini menjadi dasar bahwa protein Ki-67 merupakan penanda molekuler untuk mengevaluasi status proliferasi aktif sel manusia (Remnant *et al.*, 2021). Penanda imunohistokimia yang telah disebutkan sebelumnya berdampak pada perubahan paradigma terkait klasifikasi subtype molekuler kanker payudara. **Tabel 2.1.1** merangkum klasifikasi subtype molekuler kanker payudara yang digunakan secara klinis, dasar pengelompokan dan karakteristik epidemiologis serta klinisnya (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022).

Heterogeneitas intratumoral terjadi oleh karena faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik mencakup keragaman genomik sel tumor yang memang berbeda beda (disebut sebagai heterogeneitas klonal). Dalam

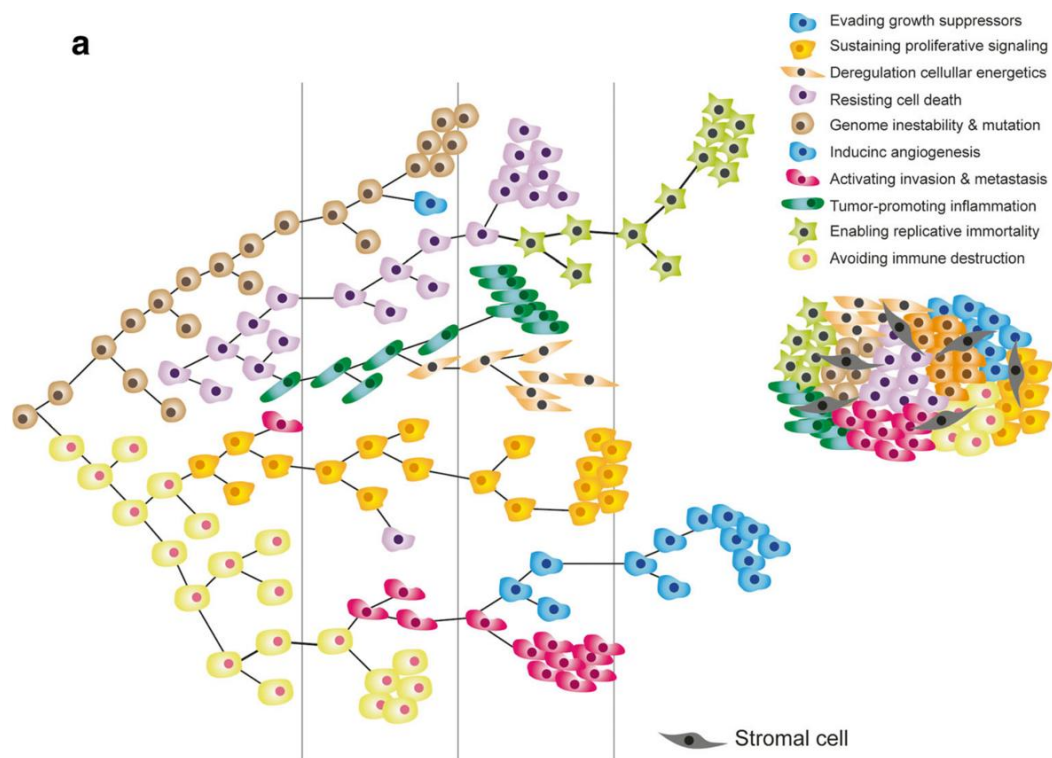
satu jaringan kanker payudara yang sama, dapat ditemukan sel ganas non-invasif, sel ganas invasif, sel punca normal, dan sel punca tumor. Keragaman seluler ini merupakan hilir dari keragaman molekulernya. **Gambar 2.1.2** menunjukkan ilustrasi terhadap asal usul heterogeneitas intratumoral yang berasal dari keragaman klonal. Ekspansi klonal sel tumor pada awalnya diinisiasi oleh ketidakstabilan genom yang pada akhirnya memungkinkan sel tersebut mengalami perubahan genotipik. Ketika ekspansi klonal ini mendominasi jaringan payudara, maka dapat diamati bahwa terdapat keragaman fenotipe dan genotipe dari setiap kelompok sel tersebut (Ramón Y Cajal *et al.*, 2020).

Tabel 2.1.1 Dasar Klasifikasi, Karakter Epidemiologi dan Klinis Subtipe Molekuler Kanker Payudara berdasarkan Heterogeneitas Intertumoral

Dasar	Luminal A	Luminal B	HER2	TNBC
Frekuensi (%)	50	15	20	15
ER	(+)	(+)	(+)/(-)	(-)
PR	(+)	(+)	(+)/(-)	(-)
HER2	(-)	(-)	(+)	(-)
Ki67	Ekspresi Rendah (<14%)	Ekspresi Tinggi	Ekspresi Tinggi	Ekspresi Tinggi
Mutasi Terkait	Tidak ada mutasi signifikan	BRCA2	p53	p53 dan BRCA1
Prognosis	Baik	Lebih baik dari HER2 dan TNBC	Cukup buruk	Sangat buruk
Rencana Terapi	Hormonal	Kemoterapi/ Hormonal	<i>Targeted Therapy</i>	Kemoterapi/ Eksperimental

Sementara itu, faktor ekstrinsik yang paling berpengaruh terhadap heterogeneitas intratumoral adalah sinyal kimiawi yang bekerja secara

parakrin dan menginduksi ketidakstabilan genomik (Gu, Xiao and Shao, 2024). Sinyal kimiawi ini sering diproduksi oleh komponen seluler peritumoral utamanya sel infiltratif yang hadir sebagai respon adanya tumor in situ. Populasi sel ini didominasi oleh sel sel imun yang berinteraksi dengan sel tumor melalui sitokin (Hassan *et al.*, 2024). Belum ada jenis sitokin tertentu yang diidentifikasi dapat menginisiasi terjadinya heterogeneitas intratumoral. Namun, beberapa implikasi klinis heterogeneitas ini telah diidentifikasi, diantaranya bahwa keragaman ini meningkatkan resiko resistensi terhadap kemoterapi dan terapi target pada kanker payudara stadium lanjut lokal dengan subtype molekuler intratumoral HER2 positif (Tanei *et al.*, 2024). Ini menunjukkan bahwa heterogeneitas intratumoral merupakan prinsip penting dalam memprediksi prognosis dan respon terhadap terapi sistemik pada kanker payudara.



Gambar 2.1.2. Heterogeneitas Intratumoral diinduksi oleh ekspansi klonal sel yang mengalami ketidakstabilan genomik. Keragaman klonal ini kemudian menghasilkan jaringan tumor yang terdiri dari banyak genotipe dan fenotipe sel. Ekspansi klonal ini dipicu oleh faktor ekstrinsik yang mencakup sitokin yang bekerja secara parakrin dan diproduksi secara dominan oleh sel imun yang menginfiltrasi lingkungan peritumoral. Prinsip penting pada paradigma ini bahwa beberapa sitokin mungkin berpengaruh dan dapat dijadikan sebagai titik balik untuk memprediksi respon terapi sistemik termasuk kemoterapi.

2.1.2. Aspek Klinis dan Biologis Kanker Payudara Stadium Lanjut lokal

Kanker payudara stadium lanjut lokal telah mengalami peningkatan insidensi di negara berkembang dan bertanggung jawab terhadap prognosis yang lebih buruk (Dhanushkodi *et al.*, 2021). Tidak ada definisi kanker payudara stadium lanjut lokal yang disepakati secara global. Namun, beberapa kepustakaan mendefinisikan stadium lanjut lokal berdasarkan klasifikasi stadium AJCC yaitu tumor tanpa bukti metastasis jauh namun dengan kesulitan resektabilitas yang tinggi yaitu stadium IIIA, IIIB, dan IIIC (Aebi, Karlsson and Wapnir, 2022).

Fenotipe biologis kanker payudara stadium lanjut telah diyakini bersifat sangat agresif dan dihasilkan dari tumor payudara stadium dini (*early breast cancer/EBC*) yang tidak segera di-intervensi (Malhotra and Tadros, 2024). Stadium ini terkait dengan spektrum tumor invasif besar yang menginfiltrasi kulit payudara dan/atau dinding dada. Genotipe biologis pada spektrum ini tidak memiliki perbedaan dengan EBC dan lebih sering ditemukan pada sub tipe molekuler HER2 positif atau TNBC (Bhardwaj *et al.*, 2023). Tumor pada spektrum ini menunjukkan tingkat angiogenesis

yang tinggi dibuktikan melalui tingginya kepadatan pembuluh darah mikro (*microvessel density/MVD*)(Krüger *et al.*, 2021).

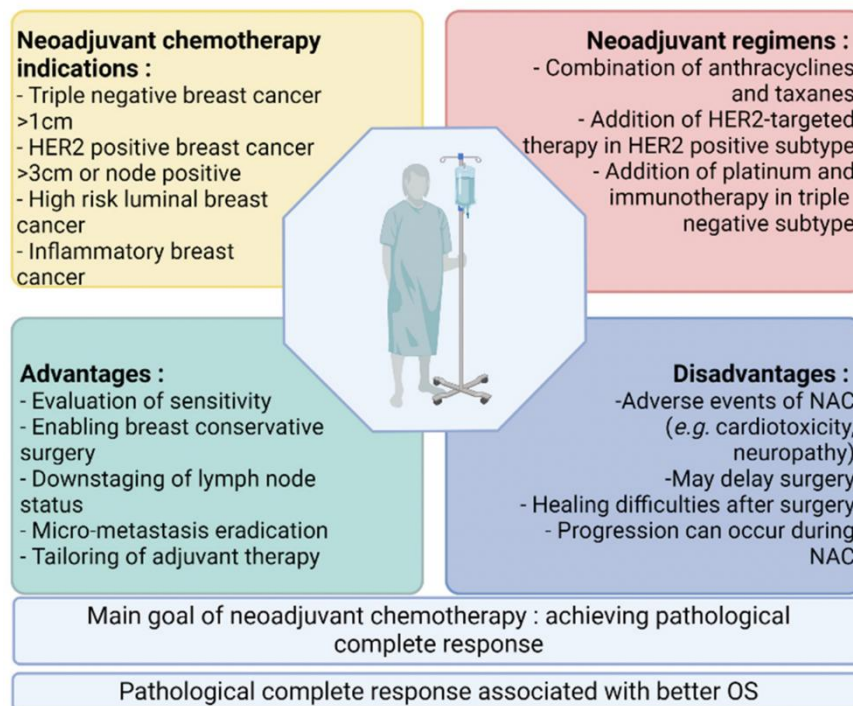
Spektrum lain dari stadium lanjut lokal adalah T4d yaitu berapapun ukuran tumor namun memenuhi kriteria sebagai kanker payudara inflamatorik (*Inflammatory Breast Cancer/IBC*). Spektrum IBC memiliki genotipe yang jauh berbeda dengan EBC dan spektrum invasif yang telah disebutkan sebelumnya. IBC memiliki progresifitas yang cepat, dan karakter angioinvasif yang tinggi. Kemampuan untuk menginvasi pembuluh darah ini memberikan potensi metastasis yang sangat tinggi pada IBC. IBC juga telah dikenal sebagai spektrum kanker payudara yang memiliki angka resistensi terhadap kemoterapi yang tinggi dan fenotipe biologis yang kompleks (Lim *et al.*, 2018; Senkus and Łacko, 2018). Agresivitas IBC dikontribusi oleh lingkungan mikrotumor dan banyak sinyal kimiawi yang dihasilkan dengan sitokin sebagai agen yang utama.

2.1.3. Peran Kemoterapi Neoadjuvant dalam Manajemen Kanker Payudara

Oleh karena fenotipe klinis kanker payudara stadium lanjut lokal yang didominasi oleh karakter dengan resektabilitas yang rendah, maka kemoterapi neoadjuvant memegang peran penting dalam mengkonversi tumor payudara yang tidak dapat dioperasi menjadi dapat dioperasi. Selain itu, kemoterapi neoadjuvant juga bertujuan mengecilkan tumor sebelum operasi untuk memungkinkan prosedur yang lebih konservatif, seperti

lumpektomi dibanding mastektomi, sehingga mempertahankan fungsi organ yang terkena (Golshan *et al.*, 2020).

Tidak ada perbedaan *survival rate* antara pasien yang diterapi dengan kemoterapi neoadjuvant dan pasien yang mendapatkan manajemen operatif yang dilanjutkan dengan kemoterapi adjuvant. Walaupun demikian, kemoterapi neoadjuvant tetap memiliki beberapa keunggulan diantaranya: memungkinkan operasi yang lebih konservatif dengan mengurangi ukuran tumor dan menurunkan status kelenjar getah bening, menilai sensitivitas tumor terhadap agen kemoterapi dan mereduksi mikrometastasis (Derouane *et al.*, 2022). Namun, modalitas ini juga memiliki beberapa kekurangan diantaranya resiko efek samping obat yang cukup tinggi dan tidak jarang menyebabkan penundaan terapi yang kemudian mengakibatkan pertumbuhan tumor yang semakin invasif. **Gambar 2.1.3** menunjukkan lanskap pengobatan kanker payudara dengan kemoterapi neoadjuvant yang mencakup indikasi, keuntungan, kerugian, dan regimen yang digunakan.



Gambar 2.1.3. Indikasi, regimen, keuntungan, dan kerugian kemoterapi neoadjuvant pada kanker payudara

Respon terhadap pemberian kemoterapi neoadjuvant diamati sangat bervariasi dan belum ada investigasi yang adekuat terkait penentu dari respon tersebut. Namun, beberapa studi melaporkan bahwa subtype TNBC sangat responsif dengan kemoterapi neoadjuvant yang diberikan (Murchison and Truong, 2021). Hal yang sama juga diamati pada subtype HER2 positif yang memberikan CR berdasarkan evaluasi histopatologis (Tse *et al.*, 2021). Penelitian baru baru ini mengungkap bahwa terdapat dua determinan respon kemoterapi neoadjuvant terhadap kanker payudara yaitu durasi kemoterapi dan subtype molekulernya. HER2 positif dan TNBC lebih responsif sedangkan tipe luminal dengan ekspresi reseptor hormonal perlu pertimbangan ulang diakibatkan rendahnya efikasi kemoterapi pada subtype molekuler ini (Joshi *et al.*, 2024). **Tabel 2.1.2** merangkum regimen

yang sering digunakan dalam memberikan kemoterapi neoadjuvant pada kanker payudara stadium lanjut lokal berdasarkan sub tipe molekulernya

Tabel 2.1.2 Regimen Kemoterapi Neoadjuvant (Korde *et al.*, 2021; Baskin *et al.*, 2024)

Subtipe Molekuler	Agen	Indikasi	Efek Samping
Luminal	Doxorubicin/Epirubicin dan Siklofosfamid	Kanker dengan reseptor hormon positif yang berukuran lebih besar dari 2 cm dan/atau dengan keterlibatan kelenjar getah bening axilla	Kardiotoksitas, rambut rontok, neuropati perifer, neutropenia demam, kelelahan, mual, diare
	CMF (Siklofosfamid, Metotreksat, dan 5-Fluorouracil)	Populasi geriatri	Rambut rontok, neuropati perifer, neutropenia demam, kelelahan, mual, diare
	TC (Doclitaxel dan Siklofosfamid)	Jika ada resiko kardiovaskuler	Rambut rontok, neuropati perifer, neutropenia demam, kelelahan, mual, diare
HER2 Positif	Doxorubicin/Epirubicin dan Siklofosfamid DAN Terapi Target Trastuzumab + Pertuzumab	Keterlibatan kelenjar getah bening axilla	Efek samping kemoterapi: Kardiotoksitas, kerontokan rambut, neuropati perifer, neutropenia demam, kelelahan, mual, diare Efek samping trastuzumab dan pertuzumab:

			Kardiotoksitas sementara, diare, neuropati perifer
TNBC	Doxorubicin/Epirubicin dan Siklofosfamid DAN Carboplatin DAN Terapi target Pembrolizumab	Belum ada investigasi klinis yang memadai	Kulit, endokrinopati, kardiotoksitas, diare, pneumopati inflamasi, radang sendi, hepatitis, nefritis

Evaluasi respon kemoterapi dapat dilakukan dengan mengkomparasikan ukuran tumor sebelum dan sesudah kemoterapi neoadjuvant, baik secara klinis, radiologis, maupun histopatologis. Terdapat dua pedoman utama dalam menstandarisasi hasil respon kemoterapi yakni WHO dan RECIST (Yu *et al.*, 2022). **Tabel 2.1.3** menunjukkan klasifikasi dan kriteria respon kemoterapi pada kanker payudara. Sebagian besar parameter bergantung pada pengukuran diameter tumor yang dapat dilakukan secara klinis (dengan alat pengukur konvensional) dan melalui USG.

Tabel 2.1.3 Klasifikasi Respon Kemoterapi

	Kriteria menurut WHO	Kriteria menurut RECIST 1.1
Complete Response (CR)	Tidak ada tumor yang ditemukan dalam pemeriksaan 2 kali secara konsekutif dengan interval 4 minggu.	Tidak ada tumor dan keterlibatan KGB aksilla yang ditemukan selama setidaknya 4 minggu
Partial Response (PR)	Pengecilan ukuran tumor sedikitnya 50% dari sebelumnya yang diukur melalui hasil multiplikasi	Pengecilan ukuran tumor sedikitnya 30% dari sebelumnya yang diukur

<i>Stable Disease (SD)</i>	diameter terpanjang dan perpendicULARnya. Tidak memenuhi kriteria PR dan PD	melalui diameter terpanjang tumor Tidak memenuhi kriteria PR dan PD
<i>Progressive Disease (PD)</i>	Pertambahan diameter tumor setidaknya 25% yang diukur melalui hasil multiplikasi diameter terpanjang dan perpendicULARnya ATAU terdapat tumor di tempat baru	Pertambahan diameter tumor terpendek setidaknya 20% ATAU pertambahan panjang setidaknya 5 mm ATAU terdapat tumor di tempat baru

2.1.4. Penanda Biologis untuk Menilai dan Memprediksi Respon Kemoterapi Neoadjuvant

Beberapa penanda biologis telah digunakan untuk memprediksi respon kemoterapi neoadjuvant pada kanker payudara. Berikut ini peneliti menguraikan penanda tersebut untuk memperkaya kerangka teori ini.

Ki-67 sebelum kemoterapi neoadjuvant

Ki-67 adalah penanda proliferasi sel yang digunakan dalam praktik klinis untuk menilai agresivitas tumor pada saat diagnosis. Ki-67 diekspresikan di semua fase siklus sel, kecuali fase G0, dan ekspresi Ki-67 yang tinggi terkait dengan proliferasi tumor yang tinggi (Remnant *et al.*, 2021). Ki-67 telah dievaluasi dalam beberapa penelitian untuk potensi prediktifnya, tetapi penggunaannya dalam indikasi tersebut masih kontroversial. Namun, sebuah meta-analisis dengan 44 studi melaporkan bahwa ekspresi Ki-67 yang tinggi pada saat diagnosis dikaitkan dengan peningkatan tingkat CR pada pasien kanker payudara stadium lanjut lokal yang telah menjalani kemoterapi neoadjuvant dengan regimen antrasiklin

dan/atau taksan (Xianyu *et al.*, 2017). Meskipun Ki-67 belum divalidasi sebagai penanda prediktif CR, nilai prognostiknya sebagian besar telah diinvestigasi. Dalam suatu meta-analisis, persentase Ki-67 yang tinggi pada saat diagnosis dan juga setelah kemoterapi neoadjuvant berkorelasi dengan prognosis yang lebih buruk (Li *et al.*, 2017). Salah satu limitasi penggunaan Ki-67 adalah kuantifikasinya yang belum adekuat untuk dikonversi menjadi data diskret. Tidak ada konsensus tentang klasifikasi Ki-67 sebagai “ekspresi tinggi” atau “ekspresi rendah”. Ambang batas masih sangat bervariasi dari 15% hingga 50%. Variabilitas antar-laboratorium dan antar-pengamat telah ditunjukkan sebagai penyebab tingginya variabilitas ambang batas ini. Sehingga, dalam praktik klinis Ki-67 harus ditafsirkan sesuai dengan nilai laboratorium lokal (Derouane *et al.*, 2022).

Ukuran tumor sebelum kemoterapi neoadjuvant

Ukuran tumor memainkan peran kunci dalam respons terhadap kemoterapi. Sebuah studi retrospektif dengan 38.864 pasien kanker payudara menunjukkan bahwa tumor dengan ukuran > 5 cm memiliki peluang lebih rendah untuk mencapai CR, terlepas dari sub tipe imunohistologisnya (Livingston-Rosanoff *et al.*, 2019). Hal ini dapat dijelaskan oleh fakta bahwa tumor yang lebih besar memiliki probabilitas yang lebih tinggi untuk menunjukkan peningkatan heterogenitas intratumoral, dengan populasi sel berbeda yang rentan memiliki sensitivitas yang bervariasi terhadap pengobatan. Oleh karena itu, ukuran tumor merupakan faktor prediktif yang relevan untuk respon terhadap kemoterapi

neoadjuvant, tetapi tidak cukup untuk memprediksi apakah pasien akan mencapai CR atau tidak (Derouane *et al.*, 2022).

Tumor-infiltrating Lymphocytes (TILs)

TIL dievaluasi pada pewarnaan hematoksilin dan eosin dan dapat dinilai pada stroma dan lingkungan intratumoral. TIL stroma terdapat di lingkungan mikrotumor tanpa kontak dengan sel tumor, sedangkan TIL intratumoral didefinisikan sebagai TIL yang ditemukan di zona tumor atau di area peritumoral yang bersentuhan dengan sel tumor. Pada kanker payudara, evaluasi TIL stroma dianggap sebagai parameter yang paling dapat direproduksi karena TIL stroma lebih banyak daripada TIL intratumoral (Liefwaard *et al.*, 2024).

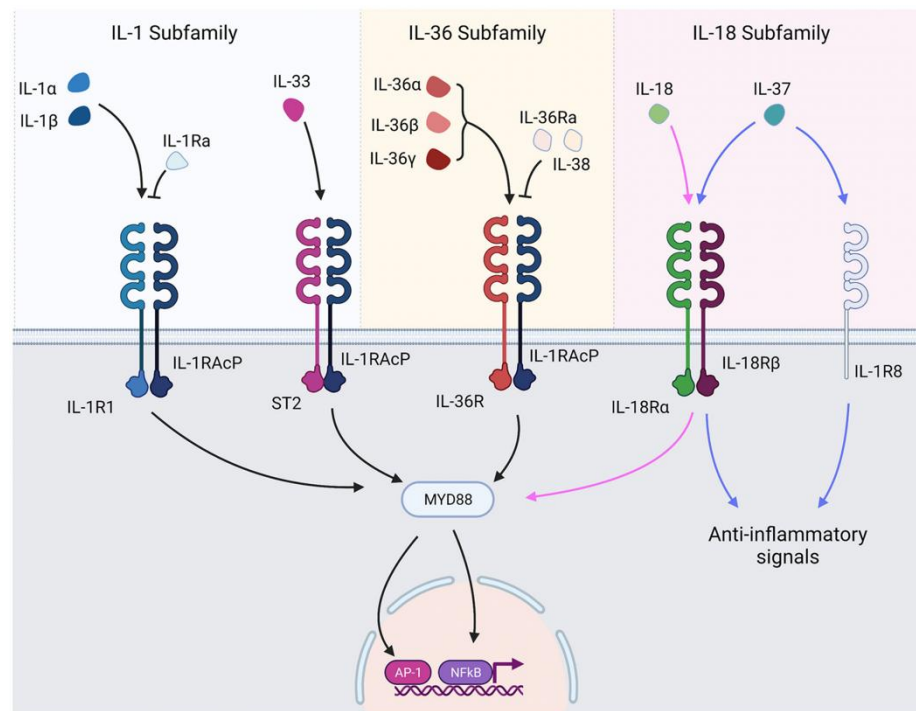
Korelasi antara tingkat TIL dan CR setelah kemoterapi neoadjuvant telah dievaluasi dalam beberapa penelitian dan pada semua sub tipe imunohistologis. Kanker payudara luminal memiliki lebih sedikit TIL dibandingkan dengan sub tipe HER2 positif dan TNBC (Derouane *et al.*, 2022). Pada EBC, tingginya persentasi TIL sebelum kemoterapi neoadjuvant berkorelasi dengan tingginya probabilitas untuk mencapai CR (Denkert *et al.*, 2018). Sebuah meta-analisis juga melaporkan korelasi tingginya TIL dan peningkatan probabilitas mencapai CR pada kanker payudara stadium lanjut lokal (Derouane *et al.*, 2022). Namun, untuk tipe HER2 positif dan TNBC yang mendapatkan terapi target, tidak ditemukan korelasi TIL dan probabilitas mencapai CR (Ignatiadis *et al.*, 2019). Terlepas dari semua RCT yang dilakukan dan studi retrospektif, data mengenai TIL

belum tampak cukup matang untuk digunakan dalam praktik klinis sebagai biomarker prediktif, meskipun hasilnya signifikan untuk pasien yang dengan HER2 dan TNBC.

2.2. GAMBARAN UMUM PERAN BIOLOGIS IL-33 DALAM BIOLOGI KANKER SECARA UMUM

Interleukin-33 pertama kali ditemukan pada endotel venula sebagai suatu protein yang terlokalisasi di nukleus (Cayrol and Girard, 2018). IL-33 memiliki similaritas struktural dengan IL-1 dan oleh karena temuan ini maka kepustakaan mengklasifikasikannya sebagai bagian integral dari superfamili IL-1 (Cayrol and Girard, 2022). Nomenklatur superfamili IL-1 merujuk pada keluarga besar dengan homologi struktural yang serupa dan mencakup 3 subfamili yaitu IL-1, IL-36, dan IL-18. **Gambar 2.2.1** merupakan penjabaran 3 subfamili tersebut beserta reseptor dan persinyalan intraselnya. Secara spesifik, efek biologis IL-33 dimediasi oleh kompleks reseptor heterodimer yang terdiri dari *IL-1 Receptor Accesory Protein* (IL-1RAcP) dan *Suppression of Tumorigenicity 2/ST2* (Macleod *et al.*, 2021). Bersama sama dengan subfamili IL-1 dan IL-36 memicu aktivitas proinflamatorik yang berkaitan dengan jalur persinyalan TIR/MyD88 dan pada akhirnya mengaktifkan dua faktor transkripsi utama yaitu *Nuclear Factor-B* (NF-B) dan *Activity Protein-1* (AP-1). Dua faktor transkripsi ini memiliki peran yang luas dalam memediasi inflamasi, autoimun, dan kanker (Cayrol and Girard, 2022; Pavitra *et al.*, 2023). Walaupun penjabaran ini mengarahkan IL-33 sebagai sitokin protumorigenesis, namun peran

biologis dan efek pleiotropiknya sangat luas dalam kaitannya dengan biologi kanker. Peneliti telah merangkum peran tersebut berdasarkan kepustakaan terbaru dibawah ini.

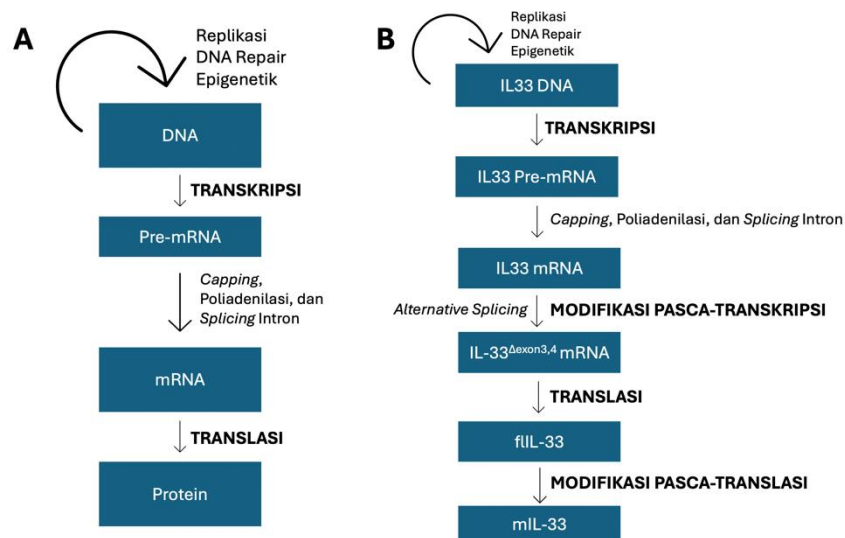


Gambar 2.2.1. Anggota Superfamili IL-1 yang terdiri dari subfamili IL-1, IL-36, dan IL-18. IL-33 merupakan anggota dari subfamili IL-1 yang bekerja melalui kompleks reseptor heterodimer ST2 dan IL-1RAcP. Jalur persinyalan intraseluler yang memediasi respon proinflamatorik yakni MyD88 dengan *downstream molecules* berupa AP-1 dan NF-κB.

2.2.1. Struktur, Fungsi, dan Regulasi IL-33

IL-33 merupakan protein yang dihasilkan dari proses translasi mRNA dari gen IL-33 (IL33) yang terletak pada kromosom 9p24.1. Namun, proses biosintesis IL-33 tidak mengikuti proses dogma sentral biologi molekuler yang umum dikenal. Keunikan dalam tahap produksinya di nukleus pertama kali di postulatkan melalui temuan bahwa ekspresi mRNA IL33 (level

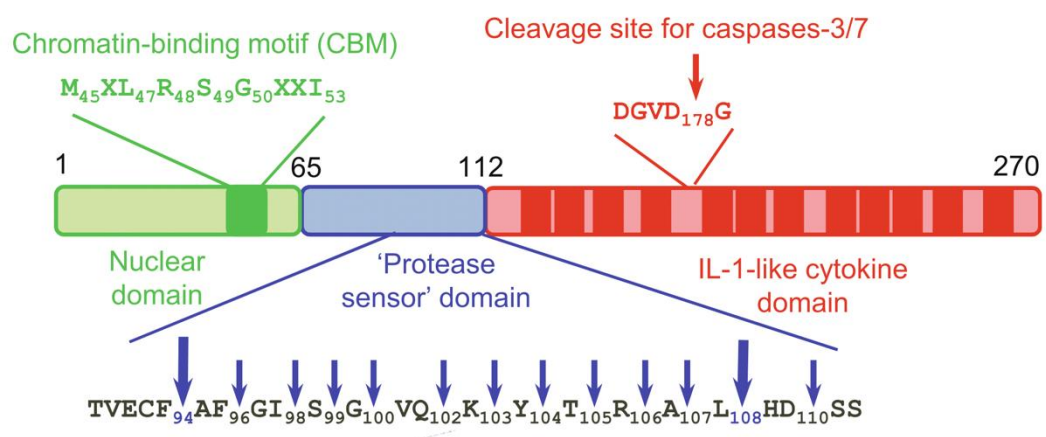
transkriptomik) tidak selalu merefleksikan ekspresi protein IL-33 (level proteomik) (Yeoh, Vu and Krebs, 2022). Ini disebabkan oleh adanya interferensi molekular setelah proses transkripsi dan translasi (Macleod *et al.*, 2021). **Gambar 2.2.2** mengilustrasikan dogma sentral biologi molekuler yang telah dikenal luas dan perbandingannya dengan proses biosintesis IL-33.



Gambar 2.2.2. Biosintesis IL-33 tidak mengikuti dogma sentral biologi molekuler yang dikenal luas. Dogma sentral biologi molekuler merupakan patron biosintesis protein yang dimulai dari DNA yang ditranskripsi menjadi pre-mRNA dan menjalani 3 proses pasca-transkripsi mencakup *capping*, *poliadenilasi*, dan *splicing* Intron menjadi mRNA matur dan pada gilirannya di translasi menjadi protein (A). Pada biosintesis IL-33, mRNA yang matur mengalami modifikasi pasca-transkripsi dengan *splicing* exon 3 dan 4 sehingga menghasilkan IL-33 yang tidak memiliki ekson 3 dan 4 (IL-33^{Δexon3,4}). Proses kemudian berlanjut dengan translasi IL-33^{Δexon3,4} menjadi *full length* IL-33 (fIL-33). Modifikasi pasca-translasi mengurangi jumlah asam amino pada fIL-33 dan mengkonversinya menjadi *mature* IL-33 (mIL-33).

fIL-33 terdiri atas 270 asam amino dan terkonformasi secara unik dengan dua subunit fungsional yang membawa fungsi fisiologis berbeda (Cayrol and Girard, 2022). **Gambar 2.2.3.** memberikan gambaran struktural dari protein fIL-33, terdiri dari 2 subunit fungsional (C-terminal dan N-

terminal) yang dipisahkan oleh 1 subunit struktural yaitu domain protease. C-terminal bertanggung jawab secara fungsional sebagai domain untuk segala aktivitas yang memicu fungsi sitokin yang sama dengan IL-1. Sedangkan, N-terminal bertanggung jawab untuk domain nuklear yang akan berikatan dengan kromatin sebagai faktor transkripsi dan epigenetik. Dengan kata lain, dua subunit fungsional ini mengakibatkan fungsi dari IL-33 menjadi luas, yaitu sebagai sitokin yang bekerja di ekstraseluler dan sebagai faktor transkripsi yang bekerja secara intraseluler (Macleod *et al.*, 2021; Cayrol and Girard, 2022; Stojanovic *et al.*, 2023).



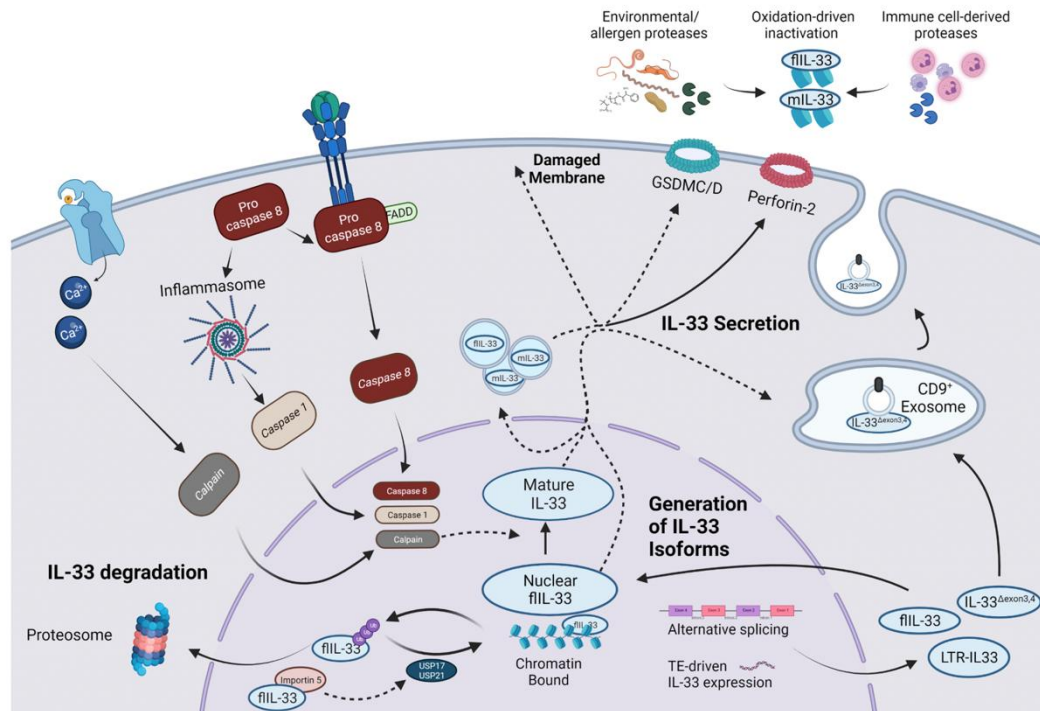
Gambar 2.2.3. Struktur Protein *Full-length* IL-33 (fIL-33). Terdiri atas 3 domain dengan dua subnit fungsional (N-terminal/hijau dan C-terminal/merah) yang dipisahkan oleh subunit struktural yaitu domain protease. N-Terminal merupakan domain nuklear yang memungkinkan fungsi intraseluer IL-33 sebagai faktor transkripsi dan epigenetik. C-Terminal merupakan domain IL-1 yang bertanggung jawab terhadap fungsi selayaknya sitokin proinflamasi di ekstraseluler. Pada C-Terminal juga didapatkan tempat caspase memotong fIL-33 menjadi mL-33 untuk kemudian disekresikan ke esktraseluler.

Fungsi ekstraseluler dari IL-33 bergantung dari konversi fIL-33 menjadi mL-33 yang dilakukan dengan cara memotong asam amino 1-178 (**Gambar 2.2.3**). Sehingga, mL-33 yang dilepas ke esktraseluler dan

berperan secara parakrin layaknya sitokin proinflamatorik lainnya hanya terdiri dari 92 asam amino (Cayrol and Girard, 2022). Regulasi sekresi IL-33 ke ekstraseluler telah lama diinvestigasi. Dogma yang paling diyakini bahwa determinan utama sekresi IL-33 ke ekstraseluler adalah respon terhadap kerusakan seluler. Secara sekuensial, dogma ini kemudian menyatakan bahwa IL-33 merupakan molekul alarmin, yaitu suatu *Damaged-associated molecular pattern* (DAMPs) yang memberikan informasi kimiawi terhadap kompleks sistem imun bahwa sel yang rusak butuh dieradikasi dari jaringan yang sehat (Stojanovic *et al.*, 2023). Namun, beberapa bukti bahwa IL-33 disekresikan oleh sel yang tidak mengalami kerusakan atau kematian telah dilaporkan (Yeoh, Vu and Krebs, 2022). Sel yang mengalami infeksi oleh beberapa mikroorganisme secara *in vivo* juga menunjukkan sekresi IL-33 yang signifikan (Mahlaköiv *et al.*, 2019; Clark *et al.*, 2021).

Maturasi fIL-33 sebelum menjadi sitokin ekstraseluler dalam bentuk mIL-33 melibatkan proses yang kompleks secara molekuler. **Gambar 2.2.4** mengilustrasikan kaskade maturasi tersebut. Modifikasi pasca transkripsi pada **Gambar 2.2.2.** menjadi titik awal kaskade maturasi ini. fIL-33 umumnya terikat pada kromatin, yang dengan demikian menentukan lokalisasinya pada nukleus dan jarang di sitoplasma. *Alternative splicing* dengan mendelesi ekson 3 dan 4 menghasilkan fIL-33 dan pada akhirnya memicu modifikasi pasca-translasi dengan berbagai metode. Nasib fisiologis fIL-33 dalam nukleus ditentukan oleh keseimbangan importin-5 dan *ubiquitin-specific protease* (USP). Dua molekul intranuklear ini

bertanggung jawab terhadap protein *turnover*, di mana importin-5 mencegah degradasi fIL-33 sedangkan USP memicu ubiquitinisasi (proses degradasi) fIL-33 (Zhou, Yan and Liu, 2020). Proses ini memungkinkan untuk menjaga konsentrasi fIL-33 tetap dalam homeostasis. fIL-33 yang tidak mengalami degradasi oleh USP akan terlepas dengan importin dan berikatan dengan kromatin pada *Chromatin-binding Motifs* (CBM). Dengan adanya aktivitas caspase, maka fIL-33 akan terlepas dengan kromatin dan dengan itu memicu pemotongan 178 asam aminonya menghasilkan mL-33 dengan 92 asam amino. IL-33 yang matur ini kemudian bertranslokasi ke sitoplasma dan berfusi dengan eksosom. Jika ada stimulus dari luar, maka eksosom akan mengalami eksositosis dan melepas mL-33 ke ekstraseluler. Selain melalui exosom, mL-33 juga dilaporkan mampu keluar bersama granzim melalui perforin pada sel T sitotoksik, melalui GSDMC pada makrofag, dan melalui membran sel yang rusak pada endotel maupun epitel (Yeoh, Vu and Krebs, 2022). Peran biologis fIL-33 di intranuklear dan mL-33 di ekstraseluler akan dijelaskan pada bagian yang lain. Namun, dengan pemahaman proses sekresinya, peneliti mampu mengidentifikasi kemungkinan kesenjangan penelitian yang dapat diisi dalam menjelaskan lebih lanjut peran biologis IL-33 terhadap biologi kanker. Selain itu, pemahaman terkait mekanisme maturasi yang diuraikan sebelumnya juga berkontribusi terhadap potensi klinis dalam menilai ekspresi imunologik IL-33 dalam sel.



Gambar 2.2.4. Regulasi Sekresi IL-33. fIL-33 yang dihasilkan melalui translasi mRNA IL-33 yang mengalami *splicing* ekson 3 dan 4 akan berikatan dengan kromatin pada CBM jika tidak didegradasi oleh mekanisme ubiquitinisasi dan proteasome. fIL-33 yang terikat dengan kromatin bertindak sebagai determinan ekspresi gen tertentu dan sebagai faktor serta kofaktor transkripsi. Apabila ada stimulus eksternal (kerusakan seluler, infeksi, dll), maka mekanisme *cleavage* 178 asam amino pada fIL-33 menjadi mIL-33 terjadi yang pada tahap selanjutnya akan bertranslokasi ke sitoplasma dan disekresikan ke ekstraseluler sebagai sitokin proinflamatorik.

2.2.2. Efek Pleiotropik IL-33 terhadap kanker

Peran biologis IL-33 dan regulasinya memiliki spektrum yang sangat luas disebabkan strukturnya yang memiliki dua subunit fungsional. Hal ini memungkinkan munculnya berbagai efek pleiotropik selain fungsi utamanya sebagai sitokin proinflamatorik di ekstraseluler. Pada kanker, IL-33 memiliki peran biologis ganda yang menunjukkan aktivitas protumoral dan antitumoral (Stojanovic *et al.*, 2023). Hal ini tergantung pada jenis sel

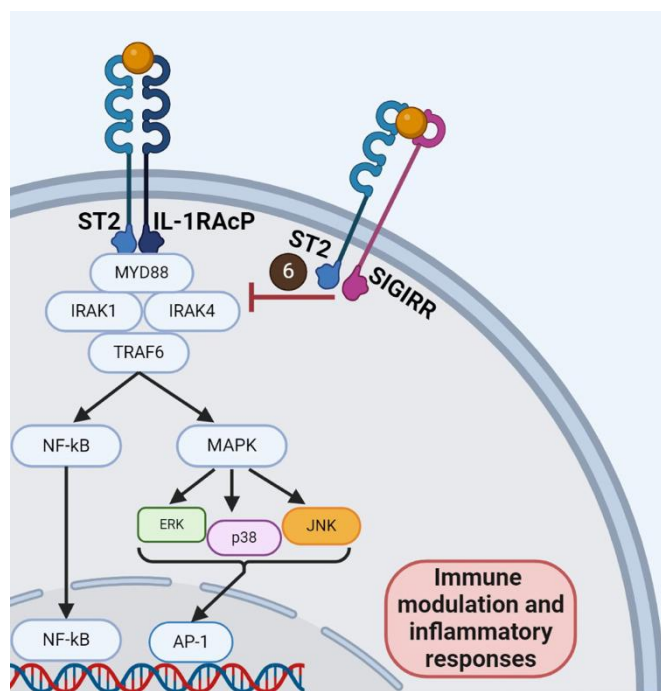
yang mengekspresikan IL-33 atau reseptornya, jenis kanker yang menjadi objek, dan model eksperimental yang digunakan (Andreone *et al.*, 2020).

Aktivitas Protumoral IL-33

Efek pleiotropik yang pertama adalah perannya sebagai sitokin pro-inflamatorik ekstraseluler yang memicu berbagai aktivasi jalur persinyalan intraselular pada sel tumor dan berkontribusi terhadap fenotipe hiperproliferatif dan invasifnya (Yeoh, Vu and Krebs, 2022; Perri *et al.*, 2024). Prinsip ini telah banyak dibahas dan tampaknya menjadi keyakinan umum bahwa IL-33 memang lebih memicu aktivitas protumoral (pembahasan kontra terhadap pernyataan ini akan lebih banyak dibahas setelah sub-bagian ini).

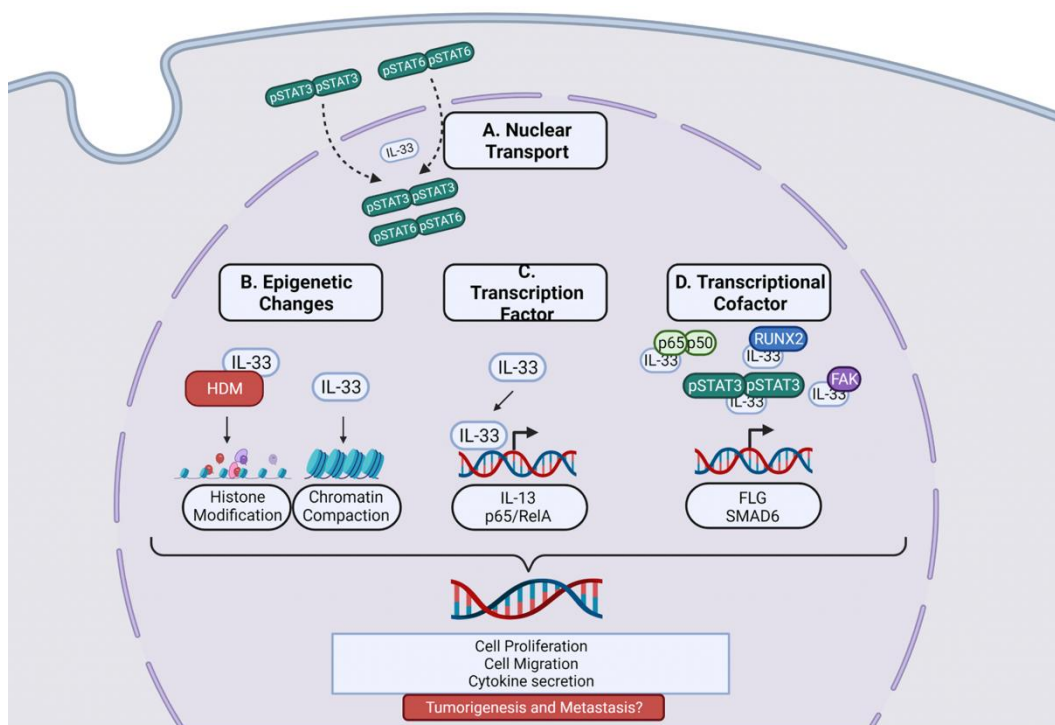
Secara mekanistik, rasionalisasi terhadap aktivitas protumoral yang diinisiasi oleh IL-33 telah dijelaskan dengan sangat baik. Secara normal, IL-33 telah diproduksi secara konstitutif (seperti yang telah ditampilkan pada **Gambar 2.2.4**) dan selama *steady-state* tetap berikatan dengan importin-5 ataupun kromatin (suatu fenomena yang disebut dengan sekuestrasi IL-33) dalam bentuk inaktif fIL-33. Ketika ada stimulus seperti kerusakan sel, infeksi, dan inflamasi oleh sebab apapun, maka fIL-33 akan mengalami maturasi menjadi mL-33 dan bertranslokasi ke sitoplasma serta akhirnya di eksositosis ke ekstraseluler. mL-33 memiliki aktivitas biologis dan afinitas terhadap reseptornya 20 kali lebih kuat daripada fIL-33 (Cayrol, 2021). Molekul efektor dari peran IL-33 sebagai sitokin ekstraseluler ini adalah NF-B dan AP-1 dan dimediasi oleh reseptor ST2 (**Gambar 2.2.1**).

NF- κ B dan AP-1 merupakan faktor transkripsi yang bersifat mitogenik dan proliferasif, ekspresinya yang tinggi pada sel tumor seiring dengan progresivitas yang cepat dan luaran klinis yang buruk (Song, Lian and Zhang, 2023). **Gambar 2.2.5** menunjukkan jalur persinyalan intraseluler yang aktif akibat stimulasi dari aksis IL-33/ST2. Aktivasi NF- κ B dan AP-1 diinisiasi oleh aktivasi Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88). Bentuk terfosforilasinya kemudian secara sekuensial mengaktifkan jalur IRAK/TRAF6/MAPK. Aktivasi MAPK sendiri memicu pembentukan pERK, p38, dan pJNK. Semuanya merupakan aktivator kinase yang meningkatkan kerja biologis AP-1 dalam memicu pertumbuhan tumor (Arrizabalaga *et al.*, 2024).



Gambar 2.2.5. Efektor Molekular IL-33. Kompleks IL-33/ST2 memicu aktivasi MyD88/IRAK/TRAF6/MAPK. Dua faktor transkripsi utama yaitu NF- κ B dan AP-1 telah diidentifikasi memicu berbagai aktivitas protumoral. Single immunoglobulin IL-1R-related molecule (SIGIRR) merupakan kontrareaksi dari kompleks ST2 yang menghambat jalur persinyalan intraseluler ini.

Prinsip mekanistik yang melibatkan aksis IL-33/ST2 dan memicu aktivasi MyD88/IRAK/TRAF6/MAPK menjadi dogma yang membuat keyakinan tentang efek pleiotropik IL-33 lebih didominasi oleh aktivitas protumoral. Sementara itu, efek nuklear dari fIL-33 intranuklear yang terikat dengan kromatin juga menunjukkan efek protumoral. **Gambar 2.2.7** menunjukkan jalur protumoral melalui aktivitas intranuklear dari fIL-33 yang mencakup aktivasi dan translokasi pSTAT 3 dan pSTAT6 yang bertanggungjawab terhadap progresivitas tumor, mengubah epigenetika kromosom dengan meningkatkan aksesibilitas terhadap faktor transkripsi, dan mendorong transkripsi secara langsung (Yeoh, Vu and Krebs, 2022).



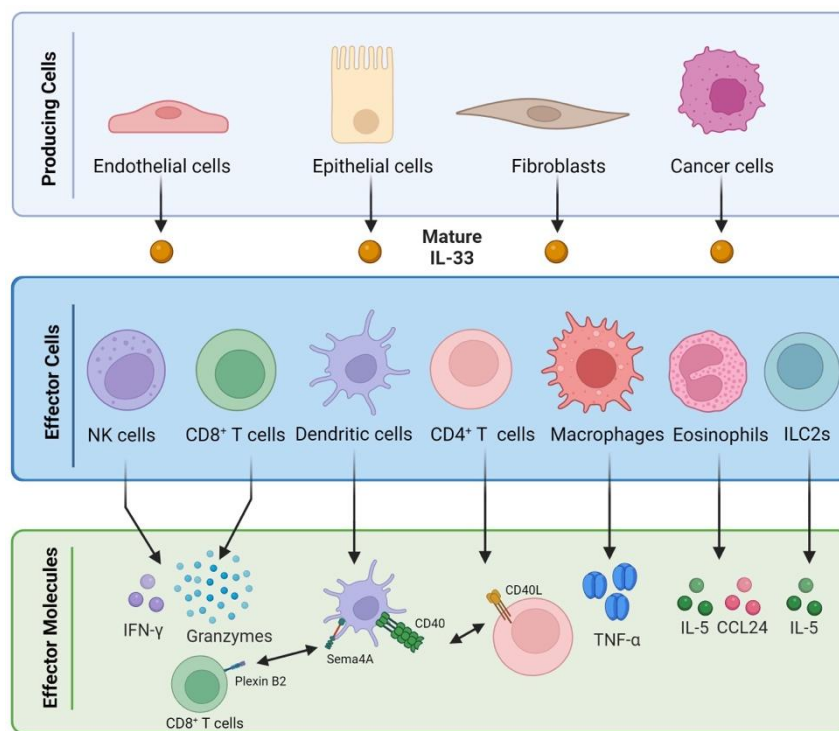
Gambar 2.2.6. Aktivitas IL-33 Intranuklear yang berikatan dengan Kromatin. A) IL-33 terlibat dalam translokasi nuklear homodimer pSTAT3 dan pSTAT6. B) IL-33 dapat menyebabkan perubahan epigenetik melalui modifikasi metilasi histon dan mempromosikan interaksi nukleosom-

nukleosom, dan mempengaruhi aksesibilitas kromatin terhadap faktor transkripsi. C) IL-33 dapat langsung mengikat daerah promotor IL-13 dan subunit NF- κ B p65/RelA, sehingga mendorong transkripsi gen-gen ini. D) IL-33 dapat berfungsi sebagai kofaktor (transkripsi) dari berbagai faktor transkripsi (p65, RUNX2, pSTAT3, FAK) dan baik menghambat atau meningkatkan aktivitas pengikatan mereka ke situs target mereka. Fungsi intranuklear IL-33 yang berbeda ini menyoroti kontribusinya dalam regulasi proliferasi sel, migrasi, dan aktivasi, semua fungsi yang mungkin memiliki peran penting dalam tumorigenesis/metastasis atau untuk imunoregulasi pada kanker.

Aktivitas Antitumoral IL-33

Meskipun aktivitas protumoral IL-33 telah diketahui dengan baik, belakangan ini telah banyak kepustakaan yang menginvestigasi lebih lanjut jalur ini dan menemukan lebih banyak efek pleiotropik yang bersifat antitumoral (Andreone *et al.*, 2020; Yeoh, Vu and Krebs, 2022; Arrizabalaga *et al.*, 2024; Nan *et al.*, 2024). Sitokin ini telah terbukti memperkuat respons imun yang dimediasi oleh Th1. Sistem ini adalah yang paling relevan dalam mengeradikasi kanker (Arrizabalaga *et al.*, 2024). IL-33 bersinergi dengan IL-12 untuk mempromosikan sel T CD4⁺ Th1 dan produksi IFN- γ oleh limfosit T CD8⁺ dan sel *Natural Killer* (NK) (Andreone *et al.*, 2020). Reseptor ST2 tidak diekspresikan oleh sel NK pada kondisi sehat, namun muncul setelah terpapar IL-12 atau TNF- α . Pada limfosit T CD8⁺, ekspresi ST2 bergantung pada faktor transkripsi T-bet, yang diekspresikan pada sel T efektor CD8⁺. Kemampuan IL-33 ini memainkan peran penting dalam membentuk lingkungan mikrotumor yang tidak mendukung pertumbuhan tumor. Ekspresi berlebih IL-33 pada sel melanoma B16 atau sel kanker payudara 4T1 menyoroti efek IL-33 sebagai penghambat kuat progresi tumor, dengan memodulasi sel T CD8⁺ dan sel NK. **Gambar 2.2.7**

menunjukkan sel sel efektor yang diaktivasi ataupun dipotensiasi oleh aksis IL-33/ST2 dan molekul efekturnya. IL-33 dewasa dapat dilepaskan oleh berbagai jenis sel, termasuk sel endotel, sel epitel, fibroblas, dan sel kanker. Setelah dilepaskan, ia dapat mempengaruhi aktivitas berbagai jenis sel imun, seperti sel NK, sel T CD8+, sel dendritik, sel T CD4+, makrofag, eosinofil, dan sel limfoid bawaan, yang menginduksi pelepasan beberapa molekul efektor.



Gambar 2.2.7. Efek Pleiotropik IL-33 terhadap Lanskap Imunitas Kanker. IL-33 secara sekuensial akan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi berbagai sel imun yang dapat mengubah lingkungan mikrotumor menjadi tidak suportif dengan pertumbuhan tumor.

Perlu dicatat bahwa IL-33 tidak hanya meningkatkan fungsionalitas sel T CD8+ tetapi juga menginduksi respons imun antitumor tipe 1 yang kuat (Asrat *et al.*, 2023; Brunner *et al.*, 2024). Induksi ini menyebabkan

peningkatan produksi molekul efektor tipe 1 yang signifikan, termasuk IFN- γ dan granzim, oleh sel T CD8⁺ dan sel NK di dalam lingkungan mikrotumor **(Gambar 2.2.6)**. Seiring pertumbuhan tumor, kompleks imunitas seluler ini memicu respons inflamasi dan mengekspresikan antigen tumor, menciptakan interaksi dinamis antara sistem kekebalan dan keganasan. Namun, perkembangan tumor menghadapi perlawanan dari limfosit tipe 1 (sel T CD4⁺ Th1, sel T CD8⁺, sel NK, dan sel T $\gamma\delta$) serta sel-sel bawaan yang berkolaborasi (sel dendritik, makrofag M1, dan neutrofil N1). Beberapa mekanisme IL-33 dalam meningkatkan imunogenisitas lingkungan mikrotumor terhadap tumor itu sendiri diantaranya:(Andreone *et al.*, 2020; Nan *et al.*, 2024)

- a. **IL-33 mempromosikan fungsi efektor dari sel T CD8⁺ dan sel NK.** Ekspresi IL-33 telah terbukti berkorelasi positif dengan perekrutan dan aktivasi sel T CD8⁺ dan sel NK dalam lingkungan mikrotumor (Brunner *et al.*, 2024; Nan *et al.*, 2024). Ekspresi transgenik IL-33 pada sel tumor atau inang menginduksi perekrutan sel T CD8⁺ yang teraktivasi serta sel NK dan menghambat pertumbuhan tumor pada tikus. Dalam model kanker payudara, IL-33 menginduksi perekrutan dan aktivasi sel NK ke paru-paru, mencegah timbulnya metastasis paru. IL-33 juga dapat meningkatkan sitotoksitas sel T CD8⁺ dan sel NK secara in vitro. IL-33 endogen dapat memediasi respons antitumor yang bergantung pada sel T CD8⁺, mendorong fungsi efektor sel T CD8⁺ melalui stimulasi sel

dendritik (DC). IL-33 terlibat dalam diferensiasi sel T menjadi *T Memory Resident Cell* (TRM), populasi sel T CD8+ yang ditemukan dalam berbagai kanker manusia dan berkorelasi dengan hasil yang menguntungkan (Andreone *et al.*, 2020).

b. IL-33 memodulasi fungsi sel T CD4+ yang ada pada lingkungan mikrotumor.

IL-33 mengaktifkan sel Th konvensional, menyebabkan polarisasi fenotipik, ekspansi klonal, dan produksi sitokin. IL-33 dapat menginduksi respons Th1 dalam kondisi tertentu, dan mendorong diferensiasi sel Th yang memproduksi IL-9, yang memiliki aktivitas antitumor yang kuat pada beberapa kanker padat tertentu. Analisis komprehensif terhadap profil sitokin yang diaktifkan oleh IL-33 dalam berbagai kanker dapat memperjelas subset sel T CD4+ yang menjadi target (Yeoh, Vu and Krebs, 2022).

c. IL-33 mengaktivasi basofil, sel mast, dan eosinofil.

Eosinofil memainkan peran penting dalam menginfiltrasi sebagian besar kanker manusia dan model eksperimental lainnya, dengan migrasi ke lingkungan mikrotumor yang dimediasi oleh eotaksin dan alarmin. IL-33 secara tidak langsung merekrut eosinofil, melainkan secara tidak langsung melalui kemokin yang dilepaskan oleh tumor (kemokin ini diaktivasi oleh IL-33 nuklear yang terikat dengan kromatin) atau melalui aktivasi *Innate Lymphoid Cells* (ILC2) dan sel mast yang memproduksi IL-5. Eosinofil dapat melakukan aktivitas anti-tumor dengan mempromosikan

perekutan sel T CD8⁺ dan melakukan sitotoksitas tumor secara langsung. Selain itu, IL-33 dapat secara langsung mengaktifkan eosinofil manusia dan tikus dengan meningkatkan penanda aktivasi, molekul adhesi, dan penanda degranulasi, yang mengakibatkan pembunuhan beberapa jenis sel tumor. IL-33 juga dapat bersinergi dengan IL-3 untuk menginduksi produksi IL-9 pada basofil manusia, yang mungkin mendukung kekebalan tumor. Lebih lanjut lagi, pada basofil manusia, IL-33 dapat meningkatkan degranulasi yang dimediasi oleh IL-3 dan anti-IgE. IL-33 juga mengaktifkan sel mast manusia, melepaskan beberapa sitokin dan meningkatkan aktivasi yang dipicu oleh kompleks imun. Namun, aktivitas pro- atau anti-tumorigenik sel mast tetap sulit untuk didefinisikan karena berbagai mediator yang mereka lepaskan (Andreone *et al.*, 2020; Yeoh, Vu and Krebs, 2022; Asrat *et al.*, 2023).

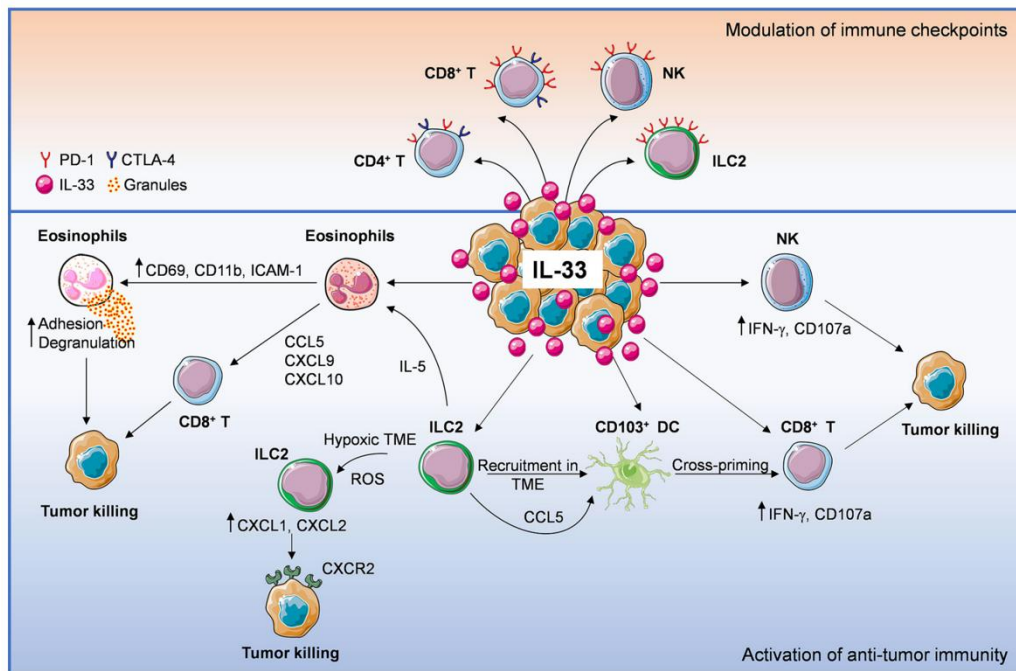
- d. **IL-33 meningkatkan aktivitas anti-tumor ILC2.** ILC2 adalah jenis sel yang mengekspresikan ST2 dan merespons langsung terhadap IL-33. Ini memungkinkan ekspansi, rekrutmen, dan aktivasi mereka. Ada dua subkelompok ILC yaitu ILC2 yang secara fisiologis telah ada pada jaringan target dan ILC2 yang hadir oleh karena inflamasi. Jumlah tinggi ILC2 dapat ditemukan dalam tumor yang kaya IL-33. ILC2 telah terbukti memiliki peran anti-tumoral dalam model melanoma tikus,

seperti rekrutmen eosinofil dan apoptosis sel tumor. Dalam model melanoma kutan manusia, pengasaman lingkungan mikrotumor yang diinduksi oleh IL-33 mengganggu kelangsungan hidup dan fungsi ILC2, yang mengarah pada pertumbuhan tumor yang cepat. Studi-studi ini menunjukkan bahwa aktivasi yang tepat dari ILC2 dapat mempromosikan fungsi anti-tumor melalui berbagai mekanisme, termasuk perekrutan eosinofil dan DC yang menyajikan antigen tumor dan menginduksi sitotoksitas (Andreone *et al.*, 2020; Yeoh, Vu and Krebs, 2022; Asrat *et al.*, 2023).

- e. **IL-33 memodulasi *Immune Checkpoints***. Imunoterapi kanker yang menargetkan *Immune Checkpoints* telah efektif dalam memicu kematian sel tumor dengan memulihkan respons sel T yang sudah ada sebelumnya. *Programmed cell death-1* (PD-1) mempromosikan apoptosis sel T spesifik dan mempertahankan perkembangan serta fungsi sel T regulator. IL-33 telah ditemukan dapat memodulasi sumbu PD-1/PD-L1 dalam kanker, meningkatkan efikasi terapeutik dari inhibitor *Immune Checkpoints*. Dalam model leukemia, IL-33 menyebabkan peningkatan ekspresi PD-1 pada sel T CD8+ di darah perifer dan tingkat PD-L1 yang lebih tinggi pada sel tumor (Andreone *et al.*, 2020; Yeoh, Vu and Krebs, 2022; Asrat *et al.*, 2023)

IL-33 telah ditemukan memiliki efek menguntungkan pada mekanisme antitumoral. Sifat anti-tumornya disebabkan oleh kemampuannya untuk

merangsang sel T CD8+, NK, DC, eosinofil, dan ILC2. Eosinofil dan ILC2 berperan dalam pengendalian tumor dan melepaskan mediator yang mereduksi kekebalan tumor dan imunoefesi (Feng *et al.*, 2024). **Gambar 2.2.8** mengilustrasikan rangkuman terhadap semua aktivitas antitumoral dari IL-33 yang telah dijelaskan sebelumnya.

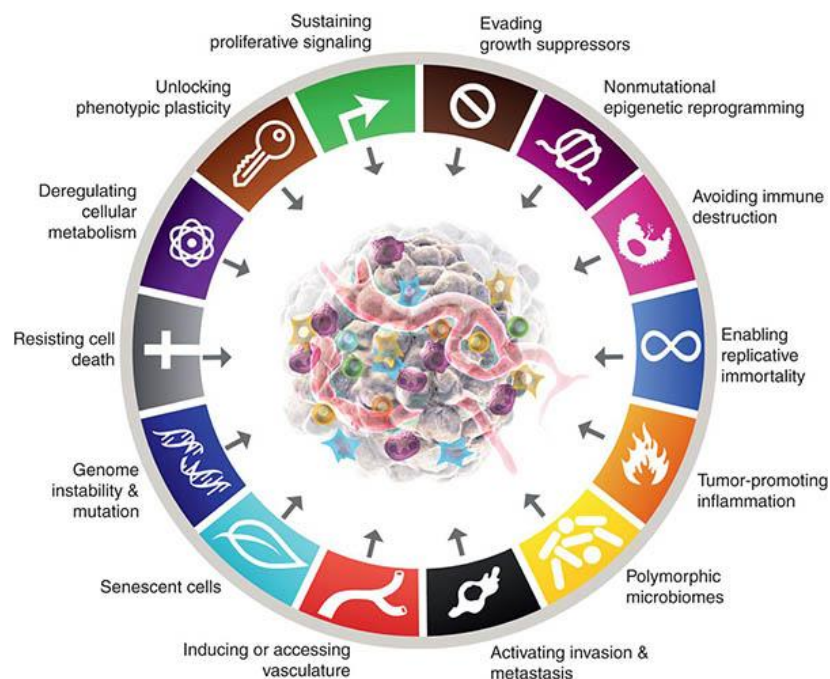


Gambar 2.2.8. Aktivitas Antitumoral IL-33. Pemberian IL-33 atau ekspresi fisiologisnya dalam lingkungan mikrotumor menyebabkan rekrutmen langsung atau tidak langsung dari beberapa sel efektor imun seperti eosinofil, ILC2, DC, sel NK, sel T CD8+, dan sel T CD4+, yang membentuk komunikasi silang atau secara langsung mengendalikan pertumbuhan tumor. Sel ILC2 dapat: 1) secara langsung menginduksi pembunuhan sel tumor melalui pelepasan CXCL1/CXCL2 dan pengikatan pada CXCR2 tumor, 2) mempromosikan perekrutan eosinofil melalui produksi IL-5, 3) melepaskan CCL5 yang memfasilitasi perekrutan DC CD103+ dan *cross-priming* sel T CD8+. Setelah paparan IL-33, rekrutmen eosinofil dapat mengakibatkan: 1) pembunuhan sel tumor secara langsung melalui degranulasi yang bergantung pada adhesi dan 2) pelepasan kemokin yang menarik sel T CD8+ (CCL5, CXCL9, CXCL10). Selain itu, IL-33 dapat mengaktifkan sel NK, sel T CD8+ (secara langsung atau melalui stimulasi sel DC yang menyajikan antigen silang) dan sel T CD4+, yang mendorong respons efektor anti-tumor. Peristiwa-peristiwa ini

mungkin terhambat oleh perekrutan sel Treg ST2+ secara bersamaan. Terakhir, IL-33 juga meningkatkan regulasi kematian sel terprogram-1 (PD-1) pada limfosit T (terutama CD8+ T), sel NK, dan ILC2, serta CTLA-4 pada sel T, yang menunjukkan bahwa sitokin ini dapat meningkatkan respons terapeutik terhadap inhibitor *Immune Checkpoints*.

2.2.3. Peran IL-33 dalam kaitannya dengan *Hallmarks of Cancer*

Hallmarks of Cancer merujuk pada seperangkat kemampuan fungsional yang diperoleh oleh sel-sel manusia yang berada pada keadaan pertumbuhan neoplastik, lebih khususnya merupakan kumpulan fenotipe biologis yang bertanggung jawab bagi kemampuan mereka membentuk tumor ganas (Hanahan, 2022). **Gambar 2.2.9** menunjukkan semua *Hallmarks of Cancer* yang berkontribusi dalam menjaga viabilitas sel tumor.



Gambar 2.2.9. *Hallmark of Cancer*.

Saat ini telah terdapat setidaknya 14 karakter spesifik kanker.

Tabel 2.2.1. mengakomodasi penjelasan singkat tentang semua *Hallmarks of cancer* dan merangkum inferensi IL-33 terhadapnya.

Tabel 2.2.1 Kaitan IL-3 dan *Hallmark of Cancer*

No	Jenis Respon	Pengaruh IL-33	Efek Pleiotropik IL-33	Referensi
1.	Mempertahankan sinyal proliferasi	IL-33 meningkatkan indeks proliferasi sel tumor in vivo	Protumoral	(Perri et al., 2024)
2.	Menghindari faktor supresor pertumbuhan	Belum ada kepastian yang spesifik	-	-
3.	<i>Non-mutational epigenetic reprogramming</i>	Bentuk fIL-33 mengikat kromatin dan mengatur ekspresi gen tertentu dengan meningkatkan/menurunkan aksesibilitas gen dengan faktor transkripsi	Ambigu (Pro/Antitumoral)	(Yeoh, Vu and Krebs, 2022)
4.	Evasi destruksi dari sel imun	IL-33 mengaktifkan dan mempotensiasi kerja sistem imun tipe 1 yang merepresentasikan aktivitas antitumor	Antitumoral	(Andreone et al., 2020; Nan et al., 2024)
5.	Replikasi immortal	Belum ada kepastian yang spesifik	-	-
6.	Mempromosi inflamasi	Aksis IL-33/ST2 memicu respon inflamasi antitumor	Antitumoral	(Andreone et al., 2020; Nan et al., 2024)

7.	Mikrobioma polimorfik	Belum ada kepustakaan yang spesifik	-	-
8.	Invasi dan metastasis	Aksis IL-33/ST2 mengaktifkan jalur PI3K/AKT/NF-κB melalui TRAF6, mendorong angiogenesis tumor yang dimediasi oleh VEGFA, yang penting untuk metastasis. Namun, aksis ini juga mengaktifkan rekrutmen sel NK ke paru paru untuk mencegah metastasis dan mengatasi mikrometastasis yang telah terjadi	Dominan antitumoral namun memiliki aktivitas protumoral.	(Che <i>et al.</i> , 2024; Zhu <i>et al.</i> , 2024)
9.	Neovaskularisasi	Aksis IL-33/ST2 mengaktifkan jalur pensinyalan PI3K/AKT/NF-κB melalui TRAF6, yang mendorong angiogenesis tumor yang dimediasi oleh VEGF	Protumoral	(Zhu <i>et al.</i> , 2024)
10.	Sel senses	Belum ada kepustakaan yang spesifik	-	-
11.	Instabilitas Genom dan Mutasi	Belum ada kepustakaan yang spesifik	-	-
12.	Resisten terhadap kematian seluler	IL-33 memicu ekspansi klonal sel T CD8+ dan sel NK yang bertanggungjawab	Antitumoral	(Andreone <i>et al.</i> , 2020; Nan <i>et al.</i> , 2024)

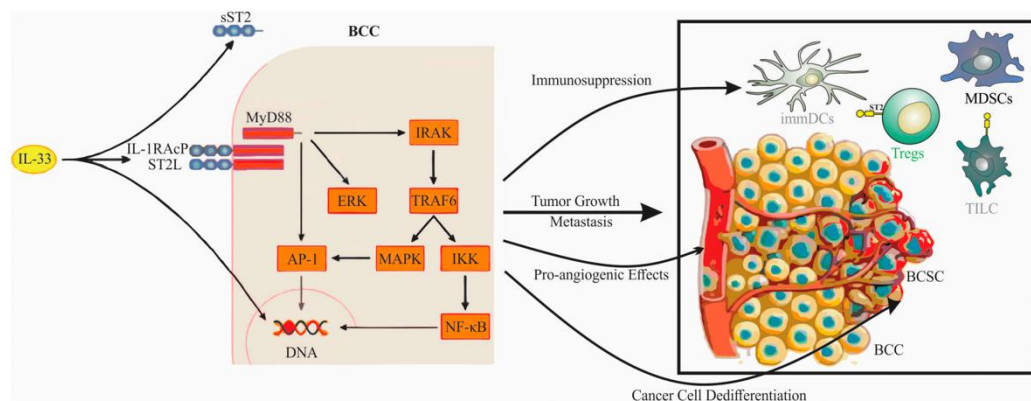
		dalam memicu kematian seluler		
13.	Deregulasi metabolisme sel	Belum ada kepustakaan yang spesifik	-	-
14.	Plastisitas	Belum ada kepustakaan yang spesifik	-	-

2.3. PERAN SPESIFIK IL-33 DALAM BIOLOGI KANKER PAYUDARA

2.3.1. Mekanisme Molekuler dan Peran Biologis IL-33 dalam Kanker Payudara

Secara historis, peran biologis IL-33 dalam biologi kanker payudara didominasi oleh aktivitas protumoralnya. **Gambar 2.3.1** mengilustrasikan aktivitas protumoral IL-33 dalam beberapa aspek pada kanker payudara (Stojanovic *et al.*, 2023). Hal ini tidak jauh berbeda dengan prinsip umum yang diilustrasikan pada **Gambar 2.2.1** dan **2.2.5**, namun jalur persinyalan intrasel yang diinisiasi oleh IL-33 pada kanker payudara bersifat lebih ekstensif (Stojanovic *et al.*, 2023; Arrizabalaga *et al.*, 2024). IL-33 memicu perubahan konformasi pada ST2 yang kemudian berikatan dengan reseptor IL-1RAcP pada membran sel. Pengumpulan ini merekrut molekul adaptor, termasuk MyD88, *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1* (IRAK-1), IRAK-4, dan *TNF Receptor Associated Factor 6* (TRAF6), yang memulai transduksi sinyal IL-33 sampai pada molekul efektor. Degradasi protein *Inhibitor of kappa B* (I κ B) mengakibatkan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B,

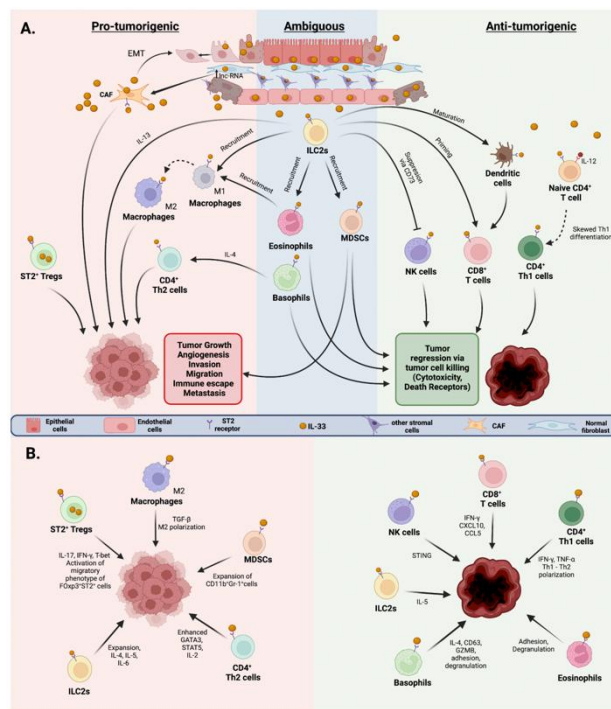
sementara *Mitogen-Activator Protein* (MAP) kinases (p38), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), dan *Extracellular signal-regulated kinases* (ERK) merangsang faktor transkripsi seperti *Activator Protein 1* (AP-1), mendorong ekspresi sitokin dan kemokin tertentu. Pembentukan kompleks ST2, IL-1RAcP, dan MyD88 memungkinkan perekrutan IRAK1,4 dan TRAF6, mengaktifkan jalur sinyal kunci seperti *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT), NF- κ B, JNK, ERK, dan p38 yang bertanggung jawab terhadap fenotipe malignansi jaringan payudara.



Gambar 2.3.1. Peran Biologis IL-33 dalam Kanker Payudara yang Didominasi oleh Aktivitas Protumoral. Kaskade sinyal IL-33/ST2 adalah komponen penting dalam perkembangan kanker payudara. Proses ini dimulai dengan pengikatan IL-33 ke kompleks reseptor, yang memicu aktivasi komponen sinyal intraseluler seperti MyD88, IRAK, ERK, dan TRAF6. Komponen-komponen ini menyebabkan aktivasi jalur NF- κ B dan MAPK, yang mengarah pada pertumbuhan tumor, metastasis, imunosupresi, efek pro-angiogenik, dan dediferensiasi sel kanker. Kaskade ini juga melibatkan aktivasi beberapa sel imun yang berada pada lingkungan mikrotumor.

Meskipun secara historis mengunggulkan peran protumoral IL-33, namun dekade terakhir justru mulai terjadi perubahan paradigma menjadi

potensi IL-33 sebagai agen antitumor karena efek pleiotropiknya dalam memicu lingkungan mikrotumor menjadi bersifat antitumor. **Gambar 2.3.2** mengilustrasikan lanskap imunitas pada kanker payudara dan kaitannya dengan IL-33. Tampak bahwa efek antitumoral sama seimbangannya dengan protumoral (Jovanovic *et al.*, 2022; Stojanovic *et al.*, 2023). Beberapa studi mengidentifikasi sel NK dengan ekspresi ST2+ yang banyak pada lingkungan mikrotumor kanker payudara dapat dimanfaatkan oleh IL-33 untuk meningkatkan kekebalan anti-tumor (Eberhardt *et al.*, 2023).



Gambar 2.3.2. Peran Biologis Protumoral dan Antitumoral IL-33 dalam Kanker Payudara A) IL-33 diekspresikan pada sel epitel, sel endotel, fibroblas, dan komponen stroma jaringan payudara. Pelepasan IL-33 mengaktifkan sel-sel imun penekan imunitas lokal seperti makrofag, Tregs, dan sel CD4+ Th2, sehingga berkontribusi pada pertumbuhan dan metastasis tumor. Sebaliknya, IL-33 juga dapat memberikan efek anti-tumor dengan mengaktifkan respons imun bawaan (NK) dan adaptif (CD4+ Th1, CD8+ sel T). B) Pengikatan IL-33 pada reseptor ST2 pada sel-sel imun menginduksi efek biologis yang berbeda yang mengakibatkan angiogenesis atau regresi tumor.

2.3.2. Interaksi Kemoterapi Neoadjuvant dan IL-33 pada Kanker Payudara

Telah lama diketahui bahwa beberapa jenis kemoterapi (utamanya antrasiklin dan oxaliplatin) dapat menginduksi kematian dari sel sel imun yang berinfiltrasi pada lingkungan mikrotumor (Apetoh *et al.*, 2007). Namun, pada kanker payudara, kemoterapi neoadjuvant meningkatkan infiltrasi sel TCD8 + dan mengurangi ekspresi *forkhead box P3* (FOXP3) di lingkungan mikrotumor, yang mengarah pada induksi respons imun antitumor (Criscitiello *et al.*, 2014; Choi, Sosman and Zhang, 2021). Albuquerque *et al* melaporkan bahwa kemoterapi neoadjuvant dapat mengurangi ekspresi mRNA IL-33 dibandingkan dengan individu yang tidak mendapat kemoterapi. Pada studi ini, tidak disebutkan regimen kemoterapi yang diberikan (Albuquerque *et al.*, 2023).

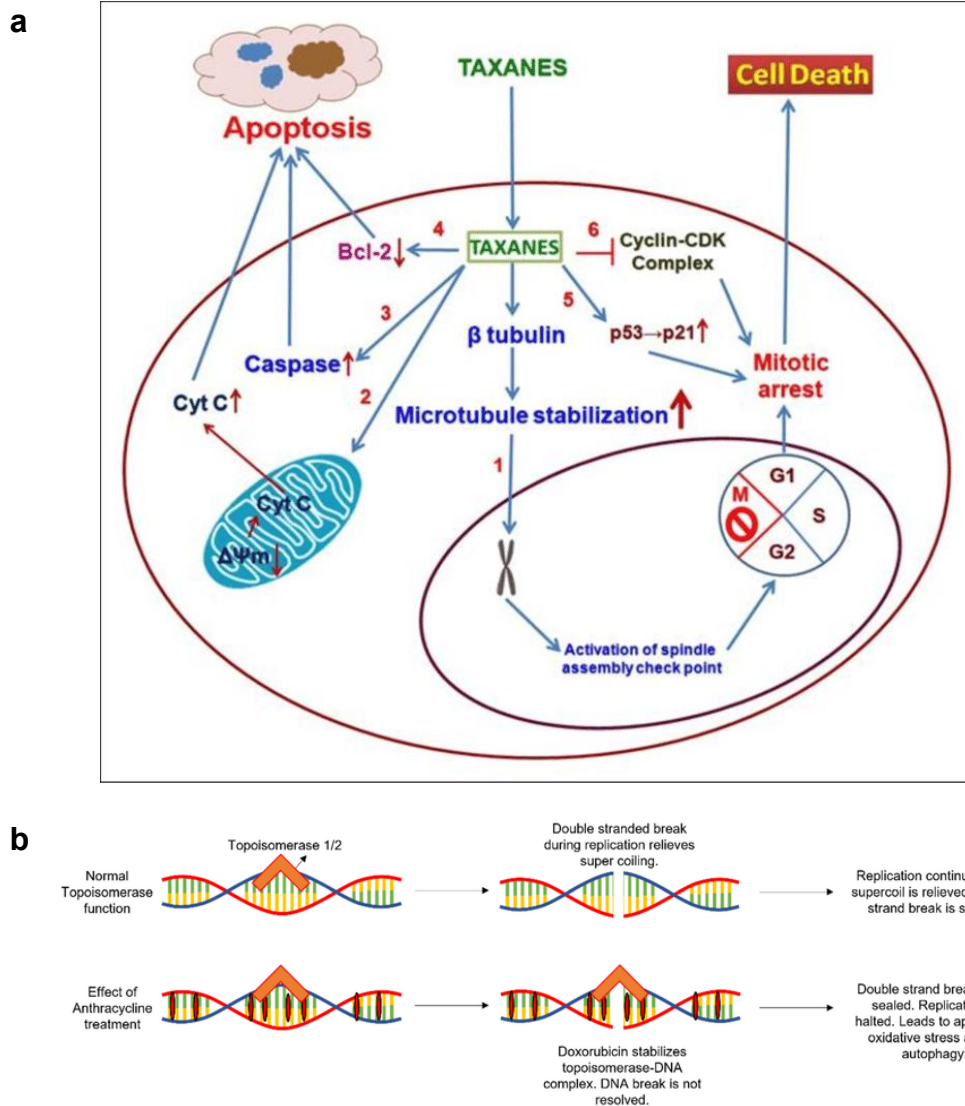
Goda *et al* melakukan investigasi terhadap pengaruh kemoterapi neoadjuvant terhadap ekspresi proteomik IL-33 pada pasien kanker payudara. Regimen kemoterapi neoadjuvant yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari empat siklus docetaxel (75 mg/m² setiap 3 minggu); 12 siklus paclitaxel (80 mg/m² setiap minggu), diikuti dengan empat siklus regimen FEC (500 mg/m² 5-fluorourasil, 100 mg/m² epirubisin, dan 500 mg/m² siklofosamid setiap 3 minggu), empat siklus regimen AC (60 mg/m² doksorubisin dan 600 mg/m² siklofosamid setiap 3 minggu), atau empat siklus regimen AC *densed dose* (60 mg/m² doksorubisin dan 600 mg/m² siklofosamid setiap 2 minggu). Penelitian ini berhasil menunjukkan

penurunan ekspresi proteomik IL-33 setelah pemberian regimen kemoterapi neoadjuvant tersebut.

Antrasiklin, seperti doxorubicin dan epirubicin, bekerja dengan cara menginterkalasi DNA sel kanker sehingga merusak struktur *double helix* DNA dan menghambat aktivitas enzim topoisomerase II yang diperlukan dalam proses replikasi dan transkripsi gen. Akibatnya, terjadi kerusakan DNA dan gangguan replikasi sel kanker. Selain itu, antrasiklin juga dapat memicu terbentuknya radikal bebas melalui mekanisme redoks, yang menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan komponen sel lainnya. Semua proses ini pada akhirnya akan memicu apoptosis atau kematian terprogram sel kanker. Antrasiklin juga dikenal dapat menurunkan kadar hormon seperti estradiol pada kanker payudara, sehingga memperkuat efek sitotoksiknya pada jenis kanker yang sensitif hormon (Van Der Zanden, Qiao and Neefjes, 2021; Bayles *et al.*, 2023).

Sementara itu, taxan seperti paclitaxel dan docetaxel bekerja dengan cara menghambat dinamika mikrotubulus di dalam sel kanker dengan berikatan pada subunit β -tubulin dan menstabilkan polimer mikrotubulus, sehingga menghalangi proses depolimerisasi mikrotubulus selama mitosis. Hal ini menyebabkan terhambatnya pembentukan *spindle* mitotik yang sangat penting untuk pembelahan sel, sehingga sel kanker akan terhenti pada fase G2/M dan tidak dapat melanjutkan siklus sel. Akibatnya, sel-sel kanker tersebut akan mengalami apoptosis. Selain itu, studi menunjukkan taxan juga dapat mengurangi interaksi antara sel kanker dan faktor pertumbuhan tertentu yang mendukung pertumbuhan tumor serta

menurunkan produksi hormon yang merangsang pertumbuhan kanker payudara (Jivani and Shinde, 2024). **Gambar 2.3.3** menunjukkan mekanisme kerja kedua agen kemoterapi ini.



Gambar 2.3.3. Mekanisme Kerja Antrasiklin dan Taxan A) Taxanes bekerja dengan menstabilkan mikrotubulus, yang menyebabkan aktivasi spindle assembly checkpoint, sehingga sel mengalami mitotic arrest (penghentian pembelahan sel di fase mitosis). Hal ini memicu jalur apoptosis melalui penurunan Bcl-2, pelepasan sitokrom c (Cyt c) dari mitokondria, aktivasi kaspase, dan akhirnya menyebabkan kematian sel. B) Dalam kondisi normal, topoisomerase II berperan penting dalam meredakan supercoiling DNA dengan cara membuat patahan sementara pada kedua untai DNA (double-stranded break), lalu menyegelnya kembali setelah tegangan berkurang, sehingga proses replikasi dapat

berlangsung secara lancar. Namun, ketika sel diobati dengan antrasiklin, obat ini akan menstabilkan kompleks antara topoisomerase II dan DNA yang telah terpotong, sehingga patahan DNA tidak dapat diperbaiki. Akibatnya, replikasi DNA terhenti dan kerusakan DNA tetap berlangsung. Hal ini kemudian dapat memicu berbagai respons seluler seperti stres oksidatif, apoptosis (kematian sel terprogram), atau autofagi.

Dalam konteks regimen NAC berbasis taxane, titik temu IL-33 dengan respons terhadap kemoterapi dapat dijelaskan melalui dua jalur yang saling melengkapi, yaitu modulasi imunitas antitumor tipe 1 dan konvergensi pada jalur kematian sel intrinsik. IL-33 merupakan alarmin yang mampu memperkuat respons imun Th1 yang esensial untuk kontrol tumor. Secara fungsional, IL-33 bersinergi dengan IL-12 dalam mendorong diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi Th1 serta meningkatkan produksi IFN- γ oleh sel T CD8⁺ dan sel NK, yang kemudian meningkatkan tekanan imunologis terhadap sel tumor (Arrizabalaga et al, 2024). Sensitivitas terhadap IL-33 pada sel efektor juga bersifat dinamis; reseptor ST2 tidak diekspresikan pada sel NK dalam keadaan basal, namun dapat terinduksi oleh IL-12 atau TNF- α , sedangkan pada sel T CD8⁺ ekspresi ST2 terkait program efektor tipe 1 yang dipandu faktor transkripsi T-bet (Arrizabalaga et al, 2024). Pada model hewan, peningkatan ekspresi IL-33 pada melanoma B16 maupun kanker payudara 4T1 dilaporkan menekan pertumbuhan tumor secara bermakna melalui penguatan aktivitas sel T CD8⁺ dan NK, sekaligus membentuk lingkungan mikrotumor yang lebih kondusif bagi efektor antitumor melalui jejaring sel dendritik, makrofag, dan populasi imun lain yang dipengaruhi oleh sumbu IL-33/ST2 (Arrizabalaga et al, 2024). Sumber IL-33 matang juga relevan secara biologis karena dapat berasal dari sel nonimun seperti

epitel, endotel, fibroblas, dan bahkan sel kanker, sehingga pelepasannya dapat menjadi penanda adanya stres jaringan dan kematian sel yang memicu komunikasi bahaya di lingkungan tumor (Arrizabalaga et al, 2024).

Dari sisi mekanisme sitotoksik, taxane bekerja terutama dengan menstabilkan mikrotubulus yang mengaktifkan *spindle assembly checkpoint* dan menimbulkan *mitotic arrest*, yang kemudian dapat berlanjut menjadi kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik. Pada level molekuler, pembunuhan sel akibat taxane berhubungan dengan perubahan regulasi protein keluarga BCL-2 dan aktivasi rangkaian kaspase setelah terjadinya permeabilisasi membran luar mitokondria (Imran et al, 2020; Zhao et al, 2022). Dalam kerangka ini, IL-33 berpotensi menjadi penguat konteks yang menambah peluang keberhasilan taxane melalui dua cara. Pertama, IL-33/ST2 mengaktifkan jalur downstream seperti NF- κ B dan MAPK, termasuk p38 MAPK, yang dikenal sebagai simpul stres seluler yang berinteraksi erat dengan penentuan nasib sel dan dinamika protein keluarga BCL-2 hingga memfasilitasi pelepasan sitokrom c dan aktivasi kaspase pada apoptosis intrinsik (He et al, 2024; Whitaker & Cook, 2021). Konvergensi sinyal stres p38 dengan modulasi BCL-2 family ini memberi rasional biologis bahwa status IL-33 yang lebih “aktif” pada mikrolingkungan tumor dapat menurunkan ambang apoptosis ketika sel tumor mengalami stres mitosis akibat taxane, walaupun besaran kontribusinya pada kanker payudara manusia tetap perlu dipastikan melalui studi translasi yang secara spesifik menguji sumbu IL-33/ST2 pada regimen taxane (Whitaker & Cook, 2021; Zhao et al, 2022). Kedua, taxane sendiri dilaporkan memiliki efek

imunomodulator pada mikrolingkungan tumor dan menjadi lebih menarik ketika dikombinasikan dengan pendekatan imunoterapi, sehingga masuk akal secara klinis bila profil IL-33 berasosiasi dengan variasi respons pada regimen berbasis taxane melalui pengaruhnya terhadap efektor tipe 1 seperti sel T CD8+ dan NK (Beretta et al, 2025; Arrizabalaga et al, 2024). Dengan demikian, interaksi IL-33 dan taxane dapat dipahami sebagai pertemuan antara “bahasa bahaya” (alarmin dan aktivasi efektor imun) dan “stres mitosis” (*mitotic arrest* menuju apoptosis), yang secara bersama-sama berpotensi memengaruhi probabilitas respons klinis pada NAC berbasis taxane.

Pada regimen NAC berbasis antrasiklin, titik temu sumbu IL-33/ST2 yang paling kuat buktinya saat ini berada pada domain kardio-onkologi. ST2 memiliki dua bentuk utama, yaitu ST2L (reseptor membran yang menyalurkan sinyal IL-33) dan sST2 (reseptor larut sebagai decoy yang mengikat IL-33 sehingga menurunkan ketersediaannya untuk ST2L). Dalam konteks paparan antrasiklin, peningkatan sST2 dipandang sebagai penanda stres miokard dan remodelling yang sekaligus merefleksikan tereduksinya efek kardioprotektif IL-33. Secara klinis, pada kohort prospektif pasien kanker payudara yang menerima kemoterapi mengandung antrasiklin, kadar sST2 meningkat bermakna sejak siklus awal dan perubahan sST2 berasosiasi dengan kejadian aritmia selama terapi, sehingga menegaskan relevansi biologis sumbu IL-33/ST2 terhadap toksisitas kardiovaskular akibat antrasiklin (Chen et al, 2024). Sintesis bukti longitudinal juga menunjukkan bahwa dinamika sST2 selama terapi

kardiotoksik (terutama antrasiklin dan antibodi anti-HER2) cenderung meningkat dan berkorelasi negatif dengan fraksi ejeksi ventrikel kiri, mendukung peran sST2 sebagai indikator remodelling yang terkait jalur IL-33 (Fazzini et al, 2025). Sejalan dengan itu, ulasan terarah pada biomarker kardiotoksisitas menempatkan sST2 sebagai decoy receptor yang menghambat efek kardioprotektif IL-33 dan karena itu layak dipertimbangkan dalam strategi pemantauan pasien yang menjalani antrasiklin (Lee and Kim, 2021). Di luar jantung, bukti eksperimental terbaru juga menunjukkan bahwa kematian sel akibat kemoterapi dapat memicu respons umpan balik imunoregulatorik melalui induksi IL-33 oleh makrofag di kelenjar getah bening drainase tumor, yang kemudian mengaktifkan Treg dan menekan imunitas antitumor sehingga berpotensi berkontribusi pada resistensi terapi, menegaskan bahwa IL-33 dapat terlibat sebagai mediator tolerogenik pascaterapi pada konteks tertentu (Lamorte et al, 2025). Pada kanker payudara, data klinik translasi juga melaporkan bahwa pasien yang telah menerima NAC menunjukkan penurunan ekspresi IL-33 dibandingkan kelompok yang belum mendapat kemoterapi, mengindikasikan bahwa paparan kemoterapi mampu memodulasi IL-33 di jaringan tumor, meskipun heterogenitas regimen tetap menjadi keterbatasan interpretasi (Albuquerque et al, 2023).

2.3.3. Potensi Klinis IL-33 dalam Manajemen Kanker Payudara

IL-33 sebagai biomarker untuk deteksi dini kanker payudara

Secara khusus, telah diamati bahwa individu yang didiagnosis dengan kanker payudara biasanya menunjukkan kadar serum IL-33 yang jauh lebih tinggi (Zhang *et al.*, 2020). Hal ini menunjukkan peran potensial sitokin ini sebagai biomarker yang sensitif. Perbedaan signifikan dalam kadar serum ini menekankan potensi IL-33 dan ST2 sebagai penanda biokimia, yang berpotensi meningkatkan strategi deteksi dini. Namun demikian, perlu dicatat bahwa beberapa studi telah melaporkan tidak adanya perbedaan yang dapat diamati dalam konsentrasi serum, menyoroti perlunya penelitian lebih lanjut untuk memvalidasi temuan ini di berbagai populasi (Derouane *et al.*, 2022). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa dalam jaringan kanker payudara ganas, 93,3% dari 45 kasus karsinoma duktal invasif pada payudara memiliki tingkat ekspresi IL-33 yang lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan normal. Selain itu, 74,4% dari 43 jaringan normal yang berdekatan dengan tumor menunjukkan jumlah sel positif IL-33 yang lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan normal lainnya (Cayrol and Girard, 2022). Namun, penelitian tentang polimorfisme genetik IL-33 dan kadar serum di antara pasien kanker payudara dan individu sehat tidak menemukan perbedaan signifikan dalam frekuensi genotipe tertentu di gen IL-33. Oleh karena itu, genotipe-genotipe ini tampaknya tidak mempengaruhi kadar serum IL-33 baik pada pasien maupun kontrol sehat (Jafarzadeh *et al.*, 2021). Hal ini mengindikasikan bahwa proses modifikasi

pasca transkripsi dan translasi memegang peran penting dalam meningkatkan ekspresi IL-33 di serum.

IL-33 sebagai indikator prognostik kanker payudara

Konsentrasi IL-33 serum yang lebih tinggi dan ekspresi proteomiknya di jaringan diamati dengan jelas pada keganasan payudara jika dibandingkan dengan jaringan sehat dan jaringan tumor yang secara histologis jinak. Selain itu, peningkatan kadar serum IL-33 tampaknya lebih nyata pada kanker payudara stadium IV lanjut, yang menunjukkan peran IL-33 dalam severitas dan progresivitas penyakit (Larsen *et al.*, 2020).

Selain itu, asosiasi yang signifikan telah diamati antara kadar IL-33 dan ST2 serta konsentrasi Matriks Metallopeptidase 11 (MMP-11) dan *Platelet-Derived Growth Factor-C* (PDGF-C). Faktor-faktor ini memainkan peran penting dalam *remodelling* jaringan dan proliferasi sel, sehingga lebih lanjut mengimplikasikan IL-33 dan ST2 dalam dinamika kompleks perkembangan kanker payudara (Yang *et al.*, 2019).

Penelitian telah menunjukkan bahwa IL-33 dan ST2 memainkan peran penting dalam perkembangan kanker payudara subtipe luminal dengan reseptor hormonal yang positif. Tingkat serum IL-33 dan ST2 yang meningkat berkorelasi dengan peningkatan VEGF dan faktor angiogenik lainnya, menunjukkan bahwa keduanya berfungsi sebagai penanda kunci untuk prognosis yang tidak menguntungkan dan penurunan tingkat kelangsungan hidup pada pasien kanker payudara subtipe luminal. IL-33 juga menginduksi resistensi endokrin, terutama pada kanker payudara ER-

positif. Rekurensi kanker terjadi pada pasien yang menjalani terapi hormon disertai dengan peningkatan kadar serum IL-33 (Stojanovic *et al.*, 2023).

Ekspresi IL-33 telah diamati jauh lebih tinggi pada kultur sel TNBC dibandingkan dengan kultur sel luminal. Tingkat ekspresi yang meningkat ini berkorelasi dengan konsentrasi miR-200b, yang merupakan pengatur positif transkripsi IL-33. Namun, tingkat miR-200b secara signifikan menurun pada kultur sel TNBC dibandingkan dengan kultur sel non-TNBC (Goda *et al.*, 2022). Hal ini mengindikasikan bahwa modifikasi transkripsi tidak terlalu berperan dalam menentukan konsentrasi IL-33. Dalam hal implikasi prognostik, analisis regresi logistik telah mengungkapkan bahwa IL-33 merupakan prediktor signifikan untuk kelangsungan hidup pada pasien dengan TNBC. Secara khusus, pasien yang menunjukkan IL-33 yang tinggi cenderung menunjukkan prognosis yang lebih baik (Goda *et al.*, 2022).

IL-33 sebagai indikator prediktif respon kemoterapi neoadjuvant pada kanker payudara

Belum ada studi yang spesifik menggunakan IL-33 sebagai indikator prediktif respon kemoterapi. Studi yang dilakukan Albuquerque menyelidiki peran IL-33 dalam hasil pengobatan kanker payudara pada manusia. Ini menganalisis 68 sampel dari pasien kanker payudara wanita Brasil yang menjalani kemoterapi neoadjuvan dan korelasinya dengan penanda klinikopatologis. Hasilnya menunjukkan peningkatan signifikan ekspresi IL-33 pada sampel pasien kanker payudara, terutama pada subtipe TNBC dan

Luminal A dan B. Subtipe Luminal B menunjukkan peningkatan signifikan dalam ekspresi IL-33 dibandingkan dengan subtipe Luminal A. Setelah pemberian kemoterapi neoadjuvant, ekspresi IL-33 turun secara signifikan (Albuquerque *et al.*, 2023). Goda *et al.* melakukan evaluasi terhadap respon kemoterapi neoadjuvant pada kanker dengan subtipe TNBC. Ekspresi proteomik IL-33 yang tinggi menjadi prediktor *complete response* yang dinilai secara patologis (Goda *et al.*, 2022).

Peran IL-33 sebagai prediktor respon kemoterapi masih belum cukup untuk sampai pada konklusi yang tegas. Peneliti ingin menginvestigasi lebih lanjut biomarker potensial ini dengan menginklusi seluruh jenis subtipe molekuler kanker payudara dan menggunakan ekspresi proteomiknya .

2.3.4. Metode dalam Mengevaluasi Ekspresi IL-33

Ekspresi IL-33 dalam kaitannya dengan upaya menginvestigasi suatu penyakit dapat dilakukan pada level genomik, transkriptomik, dan proteomik. Tiga level ini didasari oleh dogma sentral biologi molekuler yang ditampilkan pada **Gambar 2.2.2**. Evaluasi ekspresi pada level genomik dilakukan dengan mengamati ekspresi DNA yang menyusun gen IL33. Sementara itu, ekspresi transkriptomiknya diwakili oleh konsentrasi mRNA spesifik hasil transkripsi dari gen IL33. Sedangkan, ekspresi level proteomik IL-33 dapat dilakukan dengan mengidentifikasi protein translasional IL-33 baik pada intraseluler maupun ekstraseluler (melalui IL-33 serum) sesuai dengan mekanisme regulasi sekresinya yang ditunjukkan oleh **Gambar**

2.2.4. Evaluasi terhadap ekspresi IL-33 pada level genomik dan transkriptomik

Untuk mengevaluasi ekspresi IL-33 pada kedua level ini maka instrumen penting yang digunakan yaitu ekstraktor RNA dari jaringan (Ferretti *et al.*, 2021). Tujuan instrumen ini adalah untuk melakukan ekstraksi RNA, yaitu suatu proses yang memanfaatkan reagen kimiawi tertentu untuk memurnikan RNA dalam suatu jaringan. Lebih lanjut lagi, suatu jaringan (misalnya dari hasil biopsi) tidak hanya mengandung RNA saja namun dengan komponen biologis yang kompleks. Untuk mengetahui seberapa besar ekspresi IL-33 pada level transkriptomik, maka sampel harus dibersihkan dari seluruh komponen biologis yang tidak diinginkan. Ini memastikan bahwa sampel hanya mengandung RNA dan tidak terkontaminasi (Ondracek *et al.*, 2022).

Setelah ekstraksi RNA, maka sampel yang bebas kontaminasi tersebut dianalisis untuk menjalani kuantifikasi ekspresi transkriptom dan genomiknya. Ekspresi transkriptomik dilakukan dengan sekuensing RNA menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS) sedangkan ekspresi genomik dilakukan dengan konversi sekuens RNA ke *complementary DNA* (cDNA) untuk kemudian dikuantifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (Ondracek *et al.*, 2022; Albuquerque *et al.*, 2023). Pada akhirnya, ekspresi IL-33 pada level transkriptomik adalah mengukur seberapa banyak kopi mRNA yang ditemukan dalam suatu sampel, sedangkan ekspresi level genomik adalah seberapa banyak kopi DNA penyusun gen IL33 yang diidentifikasi.

Pengukuran ekspresi genomik IL-33 kurang relevan untuk dilakukan karena kompleksitas regulasinya di level transkripsional. Artinya, ekspresi genomik IL-33 tidak selalu mewakili ekspresi transkriptomik dan proteomiknya disebabkan adanya determinan yang lain yaitu modifikasi pasca translasi dan transkripsi yang dapat mengubah jumlah transkrip dan proteom yang dihasilkan. Apalagi, jumlah proteomik ini yang akan menentukan fenotipe sel kanker, bukan ekspresi genomiknya.

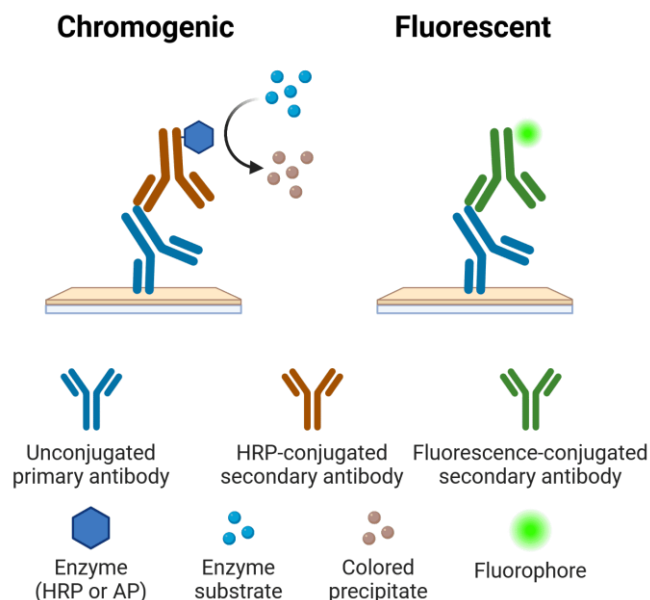
Evaluasi terhadap konsentrasi IL-33 pada level proteomik intraseluler

Pengukuran ekspresi proteomik IL-33 di intraseluler merujuk pada identifikasi protein IL-33 secara langsung (Goda *et al.*, 2022). Tujuan ini dapat diakomodasi dengan pemeriksaan imunohistokimia. Imunohistokimia (IHK) adalah teknik yang banyak digunakan untuk mendeteksi dan melokalisasi protein spesifik dalam sampel jaringan. Prinsip dasar melibatkan penggunaan antibodi sebagai prob untuk mengikat protein target (antigen) dalam sel atau jaringan (Guerin, 2023). Kompleks antigen-antibodi kemudian divisualisasikan menggunakan berbagai metode deteksi mencakup deteksi secara kromogenik dan fluoresens (**Gambar 2.3.4**).

Teknik IHK dengan metode deteksi imunofluoresensi ini digunakan untuk identifikasi antigen (dalam hal ini ekspresi proteomik sebuah produk translasi) dengan mengeksposnya ke antibodi yang sebelumnya telah dilabeli dengan pewarna fluoresen. Labelisasi ini akan menghasilkan cahaya tampak ketika terangsang oleh laser. Pengikatan antibodi spesifik

dapat ditentukan oleh produksi cahaya tampak yang khas dan terdeteksi oleh mikroskop fluoresensi (Muñoz-Castro *et al.*, 2023).

Teknik IHK dengan metode deteksi kromogenik atau enzimatik mengidentifikasi antigen dengan memanfaatkan prinsip antibodi yang mengikat secara spesifik pada antigen. Perbedaannya dengan imunofluoresen, labelisasi menggunakan enzim, bukan pewarna fluoresen. Enzim ini yang kemudian akan mengkatalisis substrat dan menghasilkan warna tertentu dibawah mikroskop cahaya (Maiques and Sanz-Moreno, 2022).

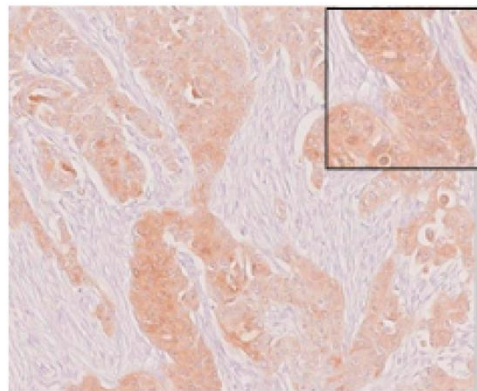


Gambar 2.3.4. Prinsip Pemeriksaan Imunohistokimia. Protein target yang akan diidentifikasi merupakan antigen spesifik yang berikatan dengan antibodi primer. Setelah terbentuknya ikatan ini, maka metode deteksi visual dilakukan dengan metode kromogenik dan fluoresens. A) Metode Kromogenik dengan menggunakan antibodi sekunder yang akan mengikat antibodi primer. Antibodi sekunder ini telah terlabelisasi dengan enzim *horseradish peroxidase* (HRP). Substrat khusus ditetaskan ke permukaan kompleks antigen dan antibodi tersebut dan kemudian dikatalisis oleh HRP menjadi zat berwarna tertentu. Zat warna ini diidentifikasi melalui mikroskop cahaya konvensional. (B) Metode

fluoresens dengan menggunakan fluorophore dan diamati menggunakan mikroskop fluoresensi.

Pada beberapa penelitian terkait IL-33 dan kanker payudara, ekspresi proteomiknya dianalisis menggunakan teknik IHK kromogenik yang menggunakan isolat antibodi monoklonal dari kelinci (Goda *et al.*, 2022).

Gambar 2.3.5. merupakan hasil IHK spesifik IL-33 pada jaringan kanker payudara subtipe TNBC yang dihasilkan oleh studi Goda *et al.*



Gambar 2.3.5. Pewarnaan IL-33 dengan Imunohistokimia Kromogenik/Enzimatik

Ekspresi ini dinyatakan secara semikuantitatif melalui skoring histokimia (*H-Score*). Parameter ini menilai imunoreaktivitas dengan mempertimbangkan beberapa variabel baik intensitas pewarnaan (*i*) maupun persentase sel yang terwarnai pada setiap tingkat intensitas (*Pi*). Nilai *i* ditunjukkan sebagai 0 (tidak ada bukti pewarnaan), 1 (pewarnaan lemah), 2 (pewarnaan sedang), dan 3 (pewarnaan kuat). Nilai *Pi* bervariasi dari 0% hingga 100%. H-score akhir diperoleh dari jumlah *i* yang dikalikan dengan *Pi* seperti persamaan yang ditunjukkan di bawah ini.

Skor ini berada dalam rentang 0 hingga 300. Skor $H < 100$, $100-199$, dan ≥ 200 masing-masing dinilai sebagai rendah, sedang, dan tinggi.