

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Hepatocellular Carcinoma* (HCC) adalah keganasan utama pada hepatosit, dan menjadi penyebab kematian paling umum di seluruh dunia.(Gao TM, *et al.* 2024) dan merupakan bentuk kanker hati yang paling umum 90% kasus.(Llovet, J.M. *et al.* 2021) Menurut data *Global Burden of Cancer* (Globocan) tahun 2022 dari *World Health Organization* (WHO) Terdapat sekitar 866.000 kasus baru dan 758.700 kematian karena kanker hati di seluruh dunia pada tahun 2022.Di Indonesia, kanker hati menempati peringkat ke-5 pada tahun 2022 dengan jumlah kasus sebesar 23.800 dan kematian sebesar 23.300. HCC menyumbang 75%-85% kasus kanker hati primer dan menjadi penyebab kematian karena kanker setiap tahunnya di seluruh dunia.(Globocan, 2022) Insiden kematian tercatat 2 hingga 3 kali lebih tinggi pada laki-laki dibandingkan perempuan.(Sung,H, *et al.*, 2021). Riskesdas 2018 menyebutkan prevalensi kanker yaitu 1,7% di Sulawesi Selatan (Pangribowo S,2019), dan kasus di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar tercatat sekitar 6,2% atau 359 kasus kanker hati dan duktus intrahepatik sepanjang tahun 2015-2017, namun tidak disebutkan secara spesifik insiden HCC.(Fadillah D,2017) Kanker hati masih menjadi tantangan kesehatan global dan insidennya terus meningkat di seluruh dunia. Diperkirakan lebih dari 1 juta orang akan terkena kanker hati setiap tahunnya (Llovet, J.M, *et al.*, 2021).

Sistem stadium HCC yang saat ini direkomendasikan adalah *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). Sistem stadium menggunakan klasifikasi *Child Turcotte Pugh* yang menilai fungsi hepar dan kriteria ukuran tumor berdasarkan penilaian adanya invasi vaskular. Sistem ini teruji validitasnya dan bisa menghubungkan stadium kanker hati dengan prediksi prognosis berdasarkan respon pengobatan. Sistem stadium menurut BCLC dibagi menjadi empat yaitu stadium BCLC A (awal), BCLC B (menengah), BCLC C (lanjut) serta stadium BCLC D (terminal) (Subramaniam, S., Kelley, R.K. and Venook, A.P. 2018).

HCC sulit didiagnosis perkembangannya, ini adalah permasalahan pada negara berkembang dengan sumber daya terbatas dalam mendiagnosis HCC.Diagnosis HCC didasarkan pada pemeriksaan laboratorium dan radiologi. Pedoman diagnosis saat ini untuk HCC tidak memerlukan biopsi hepar untuk diagnosis, lesi lebih besar dari 2 cm pada pemeriksaan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) atau *Computed Tomograph Angiography* (CTA), hasil pemeriksaan *Alpha-Fetoprotein* (AFP) meningkat lebih dari 200 ng/mL dan memiliki faktor risiko dapat didiagnosis HCC tanpa konfirmasi histologi, hal ini berdasarkan *European Association for the Study of the Liver* (EASL) (Hennedige, T and Venkatesh, S,K,2016).

*Alpha-Fetoprotein* (AFP) merupakan biomarker yang paling banyak digunakan saat ini untuk deteksi HCC. Temuan sebelumnya dari studi klinis menunjukkan bahwa serum AFP memiliki sensitivitas 61% dan spesifisitas 86% dengan nilai *cut off* adalah 20 ng/ml. Kadar AFP dapat meningkat pada beberapa kondisi seperti kehamilan, penyakit hati akut, tumor embrionik dan tumor gastrointestinal tertentu oleh karena itu biomarker diagnostik yang lebih sensitif dan akurat untuk diagnosis dini HCC pada

pasien berisiko tinggi sangat diperlukan. Selama ini para klinisi menggunakan AFP sebagai biomarker diagnostik padahal sensitivitas dari biomarker ini tergolong rendah apalagi pada tahap awal HCC. Kegagalan dalam mengenali keberadaan HCC mempengaruhi mortalitas penyakit ini, oleh sebab itu dibutuhkan modalitas diagnosis untuk dapat mendeteksi keberadaan penyakit ini. Beberapa penelitian sebelumnya pendekatan sekuensing *exome* telah mengungkapkan bahwa ada 11 jalur yang bermutasi lebih dari 5% kasus dan jalur WNT/ $\beta$ -Catenin diaktifkan secara menyimpang pada 54% kasus. Saat ini WNT/ $\beta$ -Catenin merupakan jalur onkogen yang paling sering terjadi pada HCC. *Dickkopf Related Protein 1* (DKK 1) dikode oleh gen DKK 1 merupakan protein yang bekerja dari endoderm visceral anterior. *Dickkopf Related Protein 1* merupakan penghambat jalur pensinyalan yang paling sering terganggu di HCC yaitu jalur WNT/beta-catenin dengan cara mengisolasi koreseptor *Low-density lipoprotein receptor-related protein 6* (LRP6) sehingga tidak dapat membantu mengaktifkan jalur pensinyalan WNT. *Dickkopf Related Protein 1* memberikan efek onkogenik pada hepatosit. *Dickkopf Related Protein 1* bertanggung jawab melakukan promosi peradangan, invasi tumor, migrasi sel dan diekspresikan secara berlebihan pada banyak jenis keganasan dengan tumor padat, termasuk HCC. Metode diagnostik yang ada saat ini tidak mencukupi, maka hal tersebut cukup penting untuk mengidentifikasi biomarker serum baru dengan diagnostik akurasi tinggi untuk mendeteksi dan melakukan skrining kanker stadium awal pada HCC. *Dickkopf Related Protein 1* diekspresikan berlebihan pada berbagai tumor, hal ini membuat DKK 1 menarik untuk dipertimbangkan dalam deteksi HCC (Ali-Eldin, *et al.* 2024).

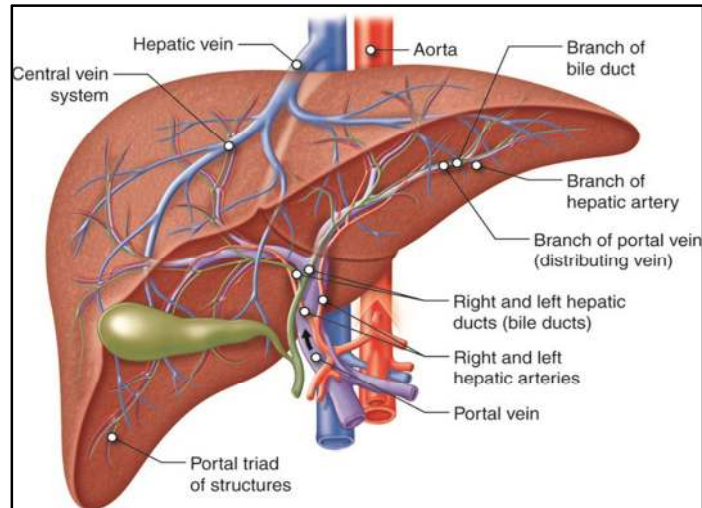
Penelitian penanda tumor AFP, DKK 1 dan kombinasi keduanya pada penderita HCC di Indonesia khususnya di Makassar sepanjang pengetahuan peneliti belum pernah dilakukan, hal ini membuat peneliti tertarik melakukan penelitian penanda tumor ini dan kombinasinya pada penderita HCC.

## 1.2 Teori

### 1.2.1 *Hepatocellular Carcinoma* (HCC)

#### Anatomi Hepar

Hepar adalah organ viscera terbesar manusia, terletak di regio *hypochondrium dextra* dan *epigastrium*, meluas ke regio *hypochondrium sinistra* dan terbentang dari kuadran kanan atas hingga kuadran kiri atas (Paulsen F, JW 2018). Hepar terletak di bawah arcus costalis kanan dan diafragma sebelah kanan yang memisahkan hepar dari pleura, paru-paru, perikardium dan jantung. Hepar memiliki 4 lobus, suplai darah 75 % ke hepar berasal dari vena porta. Lobus kanan terbagi menjadi lobus caudatus dan lobus quadratus karena adanya vesical biliaris, fissura untuk ligamentum teres hepatis, vena cava inferior, dan fisure untuk ligamentum venosum. Hepar memiliki peranan dalam memproduksi, menyimpan, mengubah dan mengeluarkan sejumlah zat yang terlibat dalam metabolisme. (Gambar 1)(Ozougwu, J.C. 2017).



Gambar 1. Anatomi Hepar.( Ozougwu, J.C. 2017)

## Fisiologi Hepar

Hepar memiliki fungsi detoksifikasi, penyimpanan glikogen, produksi empedu, imun dan pengaturan keseimbangan cairan. Selain itu hepar juga berperan untuk fungsi metabolisme yaitu (Guyton AC,H,J, 2016):

### a. Metabolisme Karbohidrat

Hepar berperan dalam menyimpan glikogen dalam jumlah besar, mengkonversi galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa, glukogenesis, glukoneogenesis serta membentuk banyak senyawa kimia penting dari hasil perantara metabolisme karbohidrat.

### b. Metabolisme Protein

Hepar berperan dalam deaminasi asam amino pembentukan ureum untuk mengeluarkan ammonia dari cairan tubuh, pembentukan protein plasma dan interkonversi beragam asam amino dan membentuk senyawa lain dari asam amino.

### c. Metabolisme Lemak

Hepar berperan dalam mengoksidasi asam lemak untuk menyuplai energi bagi fungsi tubuh yang lain, membentuk sebagian besar kolesterol, fosfolipid dan lipoprotein, membentuk lemak dari protein dan karbohidrat.

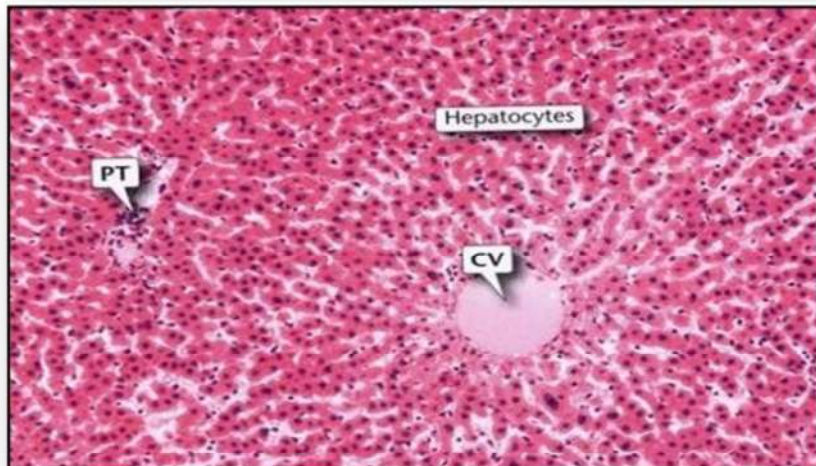
## Histologi Hepar

Sel-sel yang terdapat di hati yaitu sel hepar (hepatosit), sel endotel dan sel makrofaq yang disebut sebagai sel *kupffer*.( Paulsen F, J.W. 2018). Sinusoid hati adalah saluran yang berliku dengan diameter yang tidak teratur, dilapisi oleh sel endotel bertingkat dan tidak utuh. Sinusoid dibatasi oleh 3 sel yaitu sel endotel (mayoritas) dengan inti pipih gelap, sel *kupffer* yang fagositik dengan inti ovoid dan sel stelat atau sel liposit hepatic yang berfungsi menyimpan vitamin A dan memproduksi matriks ekstraseluler serta kolagen. Aliran darah di hati dibagi dalam unit struktural

yang disebut asinus hepatic.

Struktur lobulus dapat dikelompokkan dalam 3 golongan yang berbeda yaitu: (Maulina, M, 2018)

- Saluran portal yang merupakan bangunan berbentuk segitiga dengan vena sentralis sebagai sudut-sudutnya dan segitiga *Kiernan* atau saluran portal sebagai pusat
- Asinus hepar yang merupakan unit terkecil hepar
- Lobulus klasik yang merupakan suatu bangun berbentuk heksagonal dengan vena sentral sebagai pusat. (Gambar 2)



Gambar 2. Lobulus Hepar. Keterangan: CV = vena sentralis, PT = saluran portal. Pewarnaan HE, Pembesaran 60x.

## Definisi

*Hepatocellular Cacinoma* (HCC) adalah kanker hati primer terjadi akibat pertumbuhan sel hepar (hepatosit) yang abnormal. *Hepatocellular Cacinoma* salah satu kanker dengan prevalensi dan insidensi tertinggi di dunia, dari seluruh tumor ganas hati yang pernah didiagnosis, 85% merupakan HCC, 10% merupakan *Cholangiocarcinoma* (CC) dan 5% adalah tumor jenis lainnya seperti sistoadenokarsinoma, angiosarcoma atau leiomyosarkoma (Budihusodo, 2014). Pasien dengan HCC menunjukkan prognosis buruk dengan tingkat kelangsungan hidup 5 tahun sebesar 18% (Borgia, 2021).

## Epidemiologi

Data epidemiologi international menunjukkan bahwa kanker hati primer merupakan tumor tersering pada pria (4% dari semua kanker) dan tumor tersering pada wanita (2,3% dari semua kanker), dengan prevalensi 53/100.000 pada pria dan 22/100.000 pada wanita (rasio pria : wanita = 2:1). HCC memiliki distribusi geografis yang jelas, dengan angka kejadian tertinggi di Asia Timur, Afrika sub-Sahara dan Melanesia, dimana sekitar 85% kasus terjadi. Pada negara maju, insidennya rendah dengan pengecualian Eropa Selatan dimana insiden pada pria secara signifikan lebih tinggi daripada di daerah maju lainnya (Gordan JD, 2024).

*Hepatocellular Carcinoma* (HCC) di Indonesia masuk 5 besar kasus kanker dengan 18.468 kasus baru di tahun 2018 dan sekitar 18.148 orang diantaranya meninggal dunia. HCC menempati posisi kedua pada pria dan posisi kedelapan pada wanita dengan angka survival rate (ASR) 3,7 per 100.000 penduduk (Dinda Aprilistya Puri, Murti, S and Riastiti, Y, 2021).

## **Etiologi dan Faktor Risiko**

*Hepatocellular Carcinoma* memiliki banyak faktor yang terlibat dalam etiologi HCC. Faktor risiko utama untuk HCC antara lain:

### **a. Hepatitis B**

Infeksi hepatitis B kronik adalah penyebab utama HCC lebih dari 90% pasien dengan HCC terkait HBV dengan sirosis hati. (Yang *et al*, 2019) Karsinogenitas hepatitis B virus terhadap hati dapat terjadi melalui proses inflamasi kronik, peningkatan proliferasi hepatosit, integrasi hepatitis B virus DNA ke dalam DNA sel penjamu dan aktivitas protein spesifik hepatitis B virus yang berinteraksi dengan gen hati yang pada dasarnya terjadi perubahan hepatosit dari kondisi inaktif menjadi sel yang aktif bereplikasi menentukan tingkat karsinogenesis hati (Budihusodo, 2014).

Virus hepatitis B juga dapat menyebabkan HCC tanpa adanya sirosis, meskipun sebagian besar kasus (70% — 90%) terjadi pada pasien yang sudah memiliki sirosis. (Lesmana, 2017). Mekanisme utama karsinogenesis HCC yang diinduksi HBV yaitu HBV kronis dapat menginduksi sirosis melalui aktivasi sel T spesifik HBV, neutrophil yang dimediasi kemokin, makrofag dan *Natural Killer* (NK) kemudian sel-sel inflamasi ini mendorong karsinogenesis dengan merangsang regenerasi hepatosit, *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan kerusakan DNA. Mekanisme kedua yaitu DNA HBV dapat diintegrasikan ke dalam genom/inang, mendorong aktivasi penyisipan proto-onkogen, induksi ketidakstabilan kromosom dan transkripsi gen HBV pro- karsinogenik (Li, S. *et al.*, 2020).

### **b. Hepatitis C**

Hepatitis C virus adalah faktor risiko paling umum kedua untuk HCC dengan perkiraan 10% - 25% dari semua kasus yang dikaitkan dengan HCV di seluruh dunia. Sekitar 2,5% pasien dengan infeksi HCV kronis berkembang menjadi HCC. (Ghouri, Y,A, Mian and Rowe, J,H, 2017). Perkembangan HCC pada HCV terutama terkait dengan fibrosis dan jumlah salinan virus yang terjadi secara bertahap, biasanya berlangsung selama beberapa dekade yang timbul dari mutasi pada hepatosit dan dilatar belakangi adanya sirosis. HCV juga telah terbukti mendorong terjadinya proliferasi sel, transformasi dan pertumbuhan tumor (Li, S. *et al.*, 2020).

### **c. Sirosis Hati**

Sirosis hati adalah faktor risiko utama HCC di dunia dan melatar belakangi lebih dari 80% kasus HCC (Trevisani, F, D'Intino, *et al* 2020).

### **d. Aflatoksin**

Aflatoksin B1 (AFB1) merupakan mikotoksin yang diproduksi oleh jamur *Aspergillus*. Metabolit AFB1 yaitu AFB 1-2-3-epoksid yang merupakan karsinogen utama dari kelompok aflatoksin yang mampu membentuk ikatan dengan

*Deoxyribonucleic Acid* (DNA) maupun *Ribonucleic Acid* (RNA). Salah satu mekanisme hepatokarsinogenesisnya ialah kemampuan AFB1 menginduksi mutasi pada kodon 249 dari gen supresor tumor p53. Risiko relatif HCC dengan aflatoksin saja adalah 3% (Desai, A. *et al.* (2019).

e. **Obesitas**

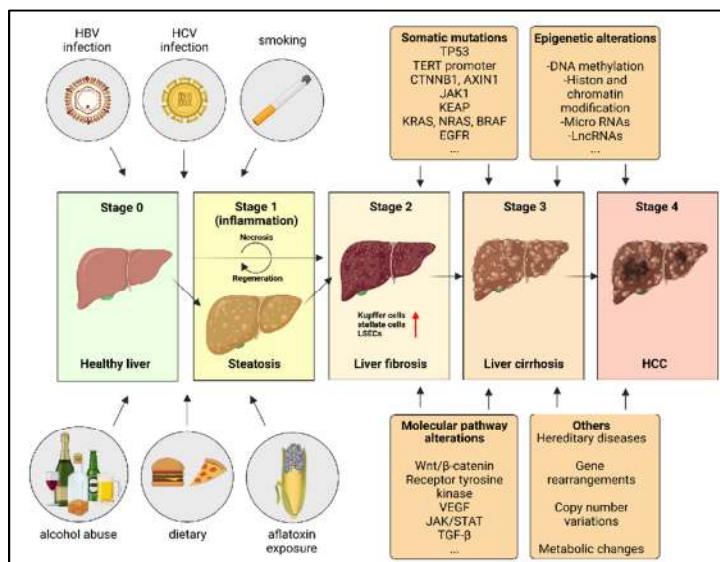
Obesitas merupakan faktor risiko utama untuk *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), khususnya *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH) yang dapat berkembang menjadi sirosis hati dan kemudian dapat berlanjut menjadi HCC. Massa Tubuh (IMT) tinggi dibandingkan dengan kelompok individu dengan IMT normal (Yang, J.D. *et al.* (2019).

f. **Diabetes Melitus**

Diabetes melitus adalah faktor risiko untuk penyakit hati kronik maupun untuk HCC mekanismenya melalui terjadinya perlemakan hati dan NASH. Diabetes Melitus dihubungkan dengan peningkatan kadar insulin dan *insulin-like growth factors* (IGFs) yang merupakan faktor potensial untuk kanker

## Patogenesis

Patogenesis *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) dimulai dari disfungsi hepatosit, disebabkan oleh mutasi yang diinduksi HBV, HCC berkembang sebagai nodul displastik melalui penyimpangan molekuler dan mutasi (Paraskevi. A Farazi 2020). Penderita sirosis hati mendorong karsinogenesis HCC dengan aktivasi sel stellata menjadi sel myofibroblast, selain itu sirosis juga meningkatkan peradangan yang mengarah ke *upregulasi* gen dan jalur pro-karsinogenik (Gambar 3) (Borgia, M *et al.*, 2021).

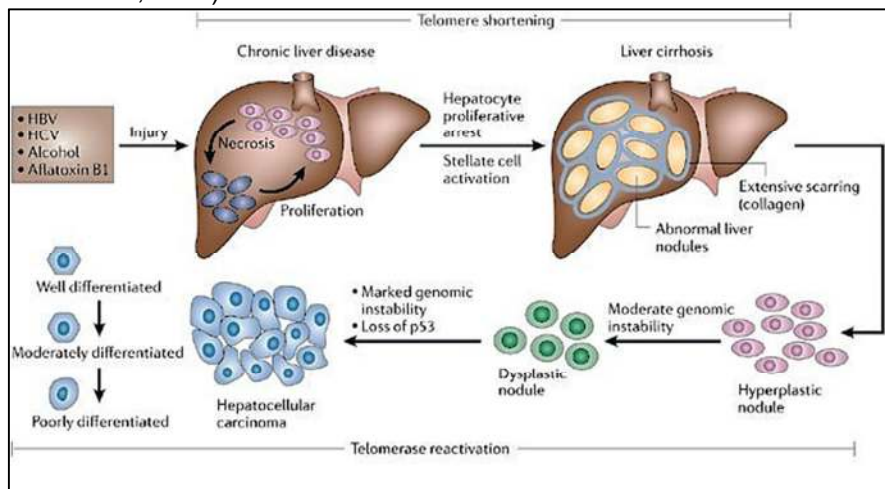


Gambar 3. Patogenesis *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) (Borgia, M *et al.*, 2021)

*Hepatocellular Carcinoma* disebabkan karena ketidakstabilan kromosom, heterozigositas dan susunan *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP) telah menunjukkan hilangnya atau mutasi pada gen supresor tumor seperti P53,

*retinoblastoma* (RB1), *CDKN2A* dan *insulin growth factor-2* (IGF-2). Adanya mutasi pada fungsi CTNNB1 ( $\gamma$ -catenin) dapat meningkatkan transkripsi MYC, cyclin D1 dan COX2 (Li, S.*et al.*, 2020).

*Hepatocellular Carcinoma* memiliki tahapan yang kompleks yaitu sel-sel hati mengakumulasi kerusakan epigenetik dan genetik berulang kali secara progresif dan membuat populasi sel prakanker mengalami transformasi kitingkat ganas. Hal ini dapat terjadi bertahap dari waktu ke waktu dimulai dengan munculnya fokus hiperplastik yang berkembang menjadi nodul displastik kemudian menjadi stadium HCC awal sebelum akhirnya berkembang menjadi ganas (Gambar 4) (Cassinotto, Aubé and Dohan, 2017).

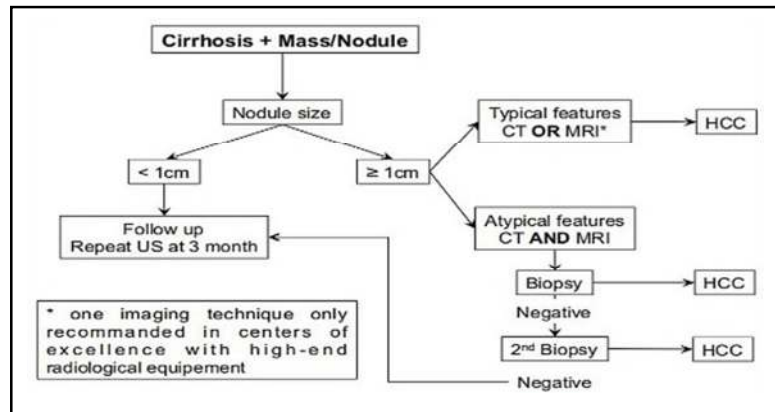


Gambar 4. Skema perkembangan dalam proses hepatokarsinogenesis (Cassinotto, Aubé and Dohan, 2017)

*Hepatocellular Carcinoma* dengan Hepatitis B Virus (HBV) sekitar 30% terjadi pada pasien non-sirosis. HBV merupakan virus DNA untai ganda yang sebagian mampu berintegrasi ke dalam sel inang, adanya aktivasi gen oleh protein pengatur menyebabkan peningkatan proliferasi sel, deregulasi kontrol siklus sel dan mengganggu perbaikan DNA maupun apoptosis (Desai *et al.*, 2019).

## Diagnosis

*European Association for the Study of the Liver* (EASL) dan *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) diagnosis HCC dapat ditegakkan tanpa pemeriksaan histologi apabila ditemukan nodul berukuran lebih dari 1 cm juga terdapat sirosis hati serta ditemukannya hipervaskularisasi arteri dan lesi pada daerah portal hepar dengan menggunakan pemeriksaan *computed tomography* (CT) atau *magnetic resonance imaging* (MRI). Sedangkan untuk lesi yang berukuran kurang dari 1 cm dapat diperiksa kembali setelah 3 bulan (Gambar 5) (Galle, P, R, *et al.*, 2018).



Gambar 5. Rekomendasi diagnosis HCC menurut *European Association for the Study of the Liver (EASL)* dan *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)* (Galle,P,R et al., 2018).

Konsensus Nasional tahun 2017 tentang penatalaksanaan *Hepatocellular Carcinoma (HCC)* merekomendasikan kriteria diagnosis HCC sebagai berikut :

### 1. Penyakit hati yang mendasari (satu faktor positif)

- a. Penyakit hati Hepatitis B
- b. Penyakit hati Hepatitis C
- c. Sirosis hepatis

### 2. Penanda tumor (salah satu pemeriksaan positif)

- a. AFP  $\geq$  200 ng/mL dan cenderung meningkat
- b. PIVKA-II  $\geq$  40 mAU/mL dan cenderung meningkat

### 3. Gambaran radiologi khas

Hipervaskular pada fase arterial dan *washout* pada fase vena porta atau fase delayed pada pemeriksaan CT scan atau MRI tiga fase.

Diagnosa HCC dapat ditegakkan apabila didapatkan **1 + 2 + 3 atau 1 + 3 atau 2 + 3**, Sedangkan apabila sangat mencurigakan suatu HCC **1 + 2 atau 2 saja** sehingga dibutuhkan pemeriksaan CT scan atau MRI tiga fase, **dan apabila 3 saja lanjutkan dengan biopsi hepar** serta apabila di dapatkan nodul dengan gambaran atipikal, khususnya nodul hipervaskuler tanpa washout pada fase vena porta atau nodul hipovaskuler pada fase arterial, pasien harus menjalani pemeriksaan lanjutan (Lesmana, 2017).

## Pemeriksaan Laboratorium

### 1. Pemeriksaan Darah Rutin, Koagulasi dan kimia darah

Sebagian besar pasien HCC mengalami anemia, leukositosis ringan, peningkatan LED dan pemanjangan *Protombin Time (PT)* dan INR. Pada kimia darah ditemukan adanya peningkatan serum *Aspartate Amino Transferase (AST)*, serum *Alanin Amino Transferase (ALT)*, kadar bilirubin, kadar *Alkaline Phosphatase (ALP)*, sedangkan kadar albumin mengalami penurunan.

## 2. Penanda Tumor

Penanda tumor untuk *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) umum digunakan adalah Alpha-fetoprotein, merupakan protein serum yang disintesis oleh sel hati fetal, sel *yolk-sac* dan saluran gastrointestinal fetal. Kadar normal AFP serum adalah 0-20 ng/mL. Kadar AFP meningkat pada 60-70% pasien HCC dan kadar > 200 ng/mL sangat sugestif HCC. Hasil positif palsu dapat ditemukan pada pasien hepatitis akut atau kronik dan pada kehamilan (Chaiteerakij, R., Addissie, B.D. and Roberts, L.R. 2018).

Penanda tumor HCC yang baru telah ditemukan selama beberapa dekade terakhir. Penanda tumor AFP-L3 atau *Lens agglutinin-reactive* AFP adalah glikoform AFP yang terfukosilasi dan telah dipelajari untuk deteksi dini HCC. Penanda tumor DCP adalah prothrombin abnormal diproduksi karena terjadinya insufisiensi vitamin K yang disebabkan oleh disfungsi transportasi intraseluler yaitu adanya gangguan penyerapan vitamin K saat hepatosit mengalami transformasi ganas. Selanjutnya adalah Gypican 3 yaitu proteoglikan heparan sulfat permukaan sel yang mengatur proliferasi sel dan penekanan tumor. Osteopontin adalah fosfoprotein yang dapat memediasi persinyalan sel yang terlibat dalam regulasi perkembangan tumor. Golgi protein-73 adalah protein transmembran yang diekspresikan dalam sel epitel dan dapat meningkat pada HCC (Zhao,y-j,et al 2017).Biomarker-biomarker ini sedang dikembangkan untuk memprediksi terjadinya HCC, diagnosis HCC, follow up pengobatan dan prognosis HCC (Tabel 1) Tsuchiya, N., et al (2015).

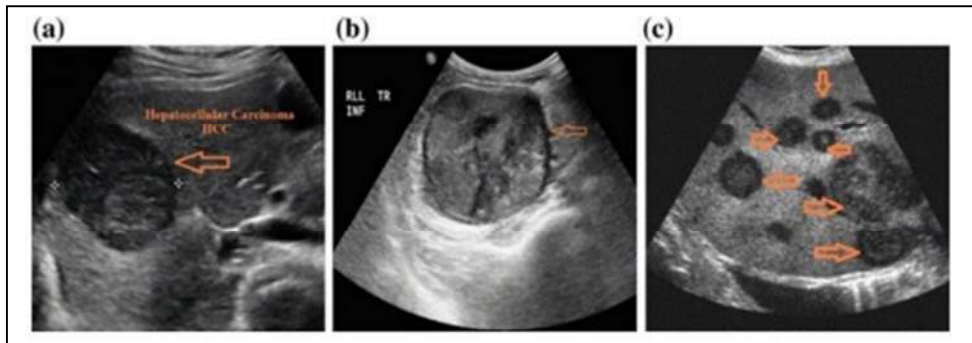
Tabel 1. Biomarker *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) Tsuchiya, N., et al (2015)

Biomarker	Sumber	Aplikasi Biomarker	Kegunaan Klinis
<b>AFP</b>	Serum	Stratifikasi risiko / Surveilans/ Diagnosis/ Prognosis	Satu-satunya biomarker HCC
<b>AFP-L3%</b>	Serum	Stratifikasi risiko / Diagnosis/ Prognosis	Lebih sensitif dariAFP, memprediksi perkembangan HCC setelah kemoembolisasi Transarterial
<b>DCP</b>	Serum	Stratifikasi risiko / Diagnosis/ Prognosis	Kombinasi DCP danAFP lebih baik dibandingkan AFP saja atau DPC saja untuk diagnosa HCC
<b>Glypican 3</b>	Serum	Diagnosis	Kinerja yang sebanding denganAFP untuk diagnosis HCC
<b>Osteopontin</b>	Plasma	Deteksi dini	Sedikit lebih baik daripada AFP di awal HCC
<b>GP73</b>	Serum	Deteksi dini	Kinerja diagnostik tergantung pada metode pengukuran
<b>DKK1</b>	Serum	Deteksi dini	Sedikit lebih baik daripada AFP di tahap sangat awal HCC

## Pemeriksaan Radiologi

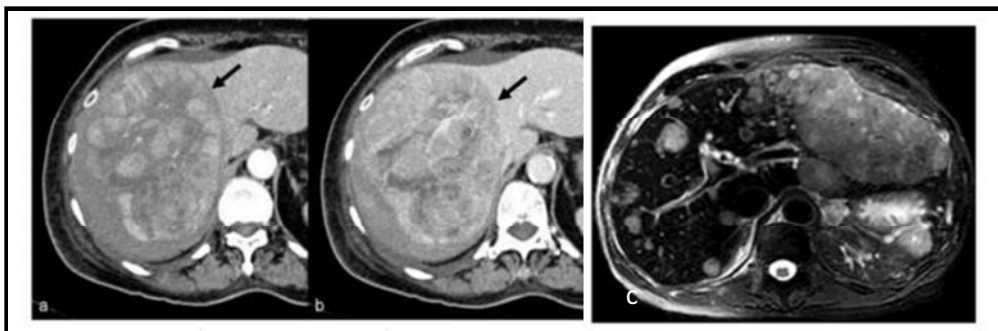
Radiologi memainkan peran yang terus berkembang dalam diagnosis dan stadium HCC dan termasuk penilaian tingkat keparahan penyakit hati kronis menggunakan tehnik non-invasif. Ultrasonografi (USG) hati merupakan modalitas kunci untuk skrining HCC yang menunjukkan sensitivitas yang memadai yaitu 60% sampai 90% dan spesifisitas 90%. Kelebihan USG yaitu bersifat non invasif, dapat

diterima oleh pasien dan relatif murah. Namun, USG memiliki keterbatasan yaitu sangat bergantung kepada operator, kinerja lebih rendah pada pasien obesitas karena gangguan akustik dan sensitivitasnya untuk nodul kecil terbatas yaitu 63% untuk HCC berukuran < 2cm (Gambar 6) (Ibraheem,M.R and Elmogy,M 2016).



Gambar 6. Gambaran USG hati dengan gambaran HCC. a. HCC ukuran kecil, b. HCC besar, dan c. banyak massa. (Ibraheem,M.R and Elmogy,M2016)

Modalitas imaging lain seperti CT-scan triphasic, MRI dan angiografi kadang diperlukan untuk mendeteksi HCC. CT-scan dan MRI digunakan untuk mengekspos, membedakan dan memeriksa massa hati. Lesi yang berukuran antara 1 cm dan 2 cm pada pasien sirosis harus diperiksa lebih lanjut *dengan computed tomograph angiography* (CTA) Triphasic dan MRI untuk menyingkirkan HCC. Selain itu, CTA *Triphasic* juga dapat mengidentifikasi nodul lebih banyak, tetapi pada pasien dengan sirosis nodular, kontras yang ditingkatkan pada MRI lebih dianjurkan (Gambar 7) (Hennedige T and Venkatesh,S.K, 2016).



Gambar 7. Gambaran CT dan MRI pada pasien HCC. HCC besar (panah hitam) di lobus kanan hati menunjukkan peningkatan heterogen dalam fase arteri (a) dan washout dan tampilan mosaik pada fase vena portal (b), HCC multifocal pada MRI (c) (Hennedige,T and Venkatesh,S.K, 2016).

### **Biopsi Hati (*Fine Needle Aspiration/ FNA-Biopsi*)**

Biopsi adalah tindakan invasif dengan memasukkan jarum dan kemudian mengambil jaringan hati. Namun, memiliki risiko bermigrasinya sel-sel tumor sepanjang bekas biopsi (Solhi, R.Pourhamzeh, M.*et al* 2024).

### Stadium Hepatocellular carcinoma (HCC)

Sistem staging berdasarkan *The Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC)* yang didukung oleh *American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)*, *European Association for the Study of the Liver and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EASL-EORTC)* dan *European Society for Medical Oncology-European Society of Digestive Oncology (ESMO-ESDO)* yang dimodifikasi sebagai staging utama untuk HCC untuk penilaian perluasan tumor untuk menentukan stadium dan strategi pengobatan yang diadopsi dari sistem staging *Union for International Cancer Control (UICC)* (Tabel 2) (Yu,S.J 2016).

Tabel 2. Sistem Staging Modifikasi *Union for International Cancer Control (UICC)* (Yu,S.J, 2016)

Stage	T	N	M
I	T1 (all 3 criteria <sup>a</sup> )	N0	M0
II	T2 (2 of 3 criteria <sup>a</sup> )	N0	M0
III	T3 (1 of 3 criteria <sup>a</sup> )	N0	M0
IVA	T4 (none of 3 criteria <sup>a</sup> )	N0	M0
	T1-4	N1	M0
IVB	T1-4	N0, N1	M1

<sup>a</sup>Criteria: (1) Number of tumors: solitary; (2) Diameter of the largest tumor: ≤ 2 cm; (3) No vascular or bile duct invasion: Vp0, Vw0, B0. Adapted from 10.

*The Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC)* pertama kali digunakan tahun 1999 dan dianggap sebagai sistem HCC standar oleh AASLD dan EASL (Tabel 3). BCLC memperhitungkan ukuran dan luas tumor primer, fungsi hati dan faktor fisiologis dan menggabungkan stadium Okuda dan skor *Child-Pugh* (Subramaniam, Kelley and Venook, 2018).

Tabel 3. Klasifikasi stadium HCC berdasarkan BCLC.(Subramaniam, Kelley and Venook, 2018)

Table 5 Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification				
Stage	PST	Tumor status		Liver function studies
		Tumor stage	Okuda stage	
Stage A: early HCC				
A1	0	Single	I	No portal hypertension and normal bilirubin
A2	0	Single	I	Portal hypertension and normal bilirubin
A3	0	Single	I	Portal hypertension and abnormal bilirubin
A4	0	3 tumors <3 cm	I-II	Child-Pugh A-B
Stage B: intermediate HCC	0	Large multinodular	I-II	Child-Pugh A-B
Stage C: advanced HCC	1-2*	Vascular invasion or extrahepatic spread	I-II	Child-Pugh A-B
Stage D: end-stage HCC	3-4 <sup>†</sup>	Any	III	Child-Pugh C

PST, Performance Status Test; Stage A and B, All criteria should be fulfilled; \*, Stage C, at least one criteria: PST1-2 or vascular invsion/extrahepatic spread; <sup>†</sup>, Stage D, at least one criteria: PST3-4 or Okuda Stage III/Child-Pugh C.

Skor *Child-Pugh* adalah sistem penilaian fungsi hati yang paling sederhana dan banyak digunakan. Penilaian klinis yang digunakan berupa adanya ensefalopati, asites, status gizi dan pengukuran laboratorium bilirubin serum dan albumin (Tabel 4) (Subramaniam, Kelley and Venook, 2018).

Tabel 4. Skor *Child-Pugh* (Subramaniam, Kelley and Venook, 2018)

Table 2 Child-Turcotte-Pugh score			
Measurements	Score		
	1	2	3
Encephalopathy	None	Mild	Moderate
Ascites	None	Slight	Moderate
Bilirubin (md/dL)	1-2	2-3	>3
Albumin (mg/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
PT (seconds prolonged)	<4	4-6	>6

Stage A, 5-6 points; Stage B, 7-9 points; Stage C, 10-15 points.

### Komplikasi

Komplikasi pada HCC paling sering yaitu koma hepaticum sekitar 37,5% dan dapat terjadi perdarahan masif akibat pecahnya varises esofagus berupa hematemesis dan melena sebanyak 31,2% serta terjadi syok akibat nyeri hebat sebanyak 25% (Dimitroulis,D, et al 2017).

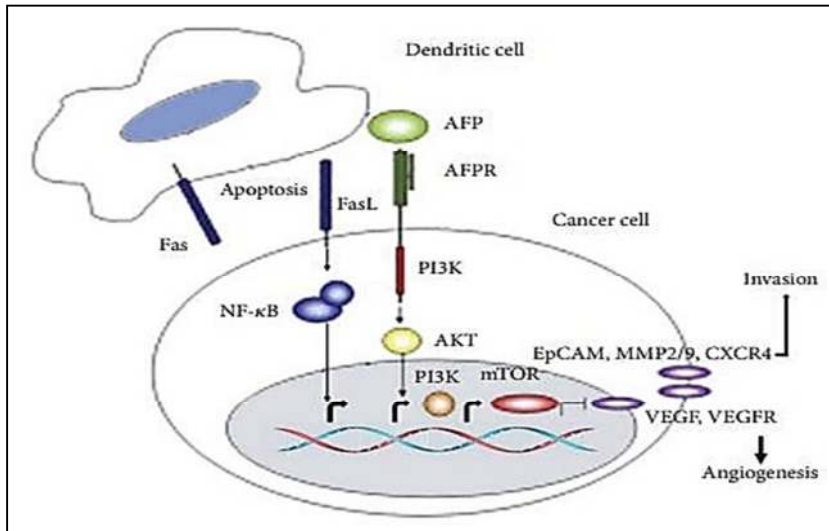
### 1.2.2 ALPHA-FETOPROTEIN (AFP)

Ketertarikan pada *Alpha-fetoprotein* (AFP) sejak awal 1960-an, ketika peningkatan kadar AFP serum ditemukan terkait dengan HCC. Hal ini menyebabkan karakterisasi AFP sebagai salah satu protein onkofetal prototipe yang hadir selama kehidupan janin, dan tidak ada dalam jaringan dewasa normal serta diaktifkan kembali pada pasien yang menderita tumor. *Alpha-fetoprotein* adalah suatu glikoprotein serum normal dengan berat molekul kira-kira 67,3 kDa terletak pada lengan panjang kromosom 4 manusia (4q11-q13) yang disintesis oleh sel parenkim hati fetal, sel *yolk-sac* dalam kondisi normal pada periode ontogenesis (Lin B, Wang Q, et al. 2022)..

Protein AFP terdiri dari 609 asam amino mengandung 15 ikatan disulfida dan terdiri dari 3 domain yang membentuk struktur seperti "V". *Alpha-fetoprotein* berfungsi sebagai protein transpor serum yang mengikat banyak molekul termasuk estrogen, asam lemak, bilirubin, steroid serta logam berat (tembaga dan nikel) yang berpotensi mengontrol proliferasi dan diferensiasi sel pada janin yang sedang berkembang serta pertumbuhan sel tumor.( Chaiteerakij,et al 2018)

*Alpha-fetoprotein* terdapat pada permukaan sel atau didalam sitoplasma yang dimediasi oleh endositosis reseptor yang memiliki berbagai fungsi biologis seperti fungsi transportasi, pengangkutan ion logam, obat-obatan, bilirubin dan steroid.*Alpha-*

*fetoprotein* memainkan peran penting dalam regulasi proliferasi sel, yang dimediasi oleh reseptor, transpor sinyal dan ekspresi gen. Proliferasi sel kanker yang dimediasi oleh pengikatan reseptor AFP (AFPR) melalui aktivasi jalur sinyal PI3K/AKT. Adanya invasi tumor dan metastasis terjadi melalui peningkatan regulasi protein terkait metastasis seperti keratin 19 (K19), molekul adhesi sel epitel (EPCAM), matriks metalloproteinase 2/9 (MMP2/9) dan reseptor kemokin CXC4 (CXCR4). Terjadinya angiogenesis tumor dengan meningkatkan ekspresi pertumbuhan endotel vaskuler factor (VEGF), reseptor faktor pertumbuhan endotel vaskuler 2 (VEGFR-2) dan matriks metalloproteinase- 2/9 (MMP2/9)(Gambar 8)( Wang,X and Wang Q 2018).



Gambar 8. Mekanisme Alpha-Fetoprotein pada pertumbuhan sel kanker (Wang, X and Wang Q 2018)

Keterangan :

- NF-κB : Nuclear Factor Kappa- Light-Chain-enhancer of activated B cells
- P13K : Phosphatidylinositol 3-kinase
- AFPR : Alpha –Fetoprotein Reseptor
- EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
- MMP29 : matriks metalloproteinase
- CXCR4 : C-C-C Chemokine Receptor type 4
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
- VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
- mTOR : Mechanistic target of rapamycin

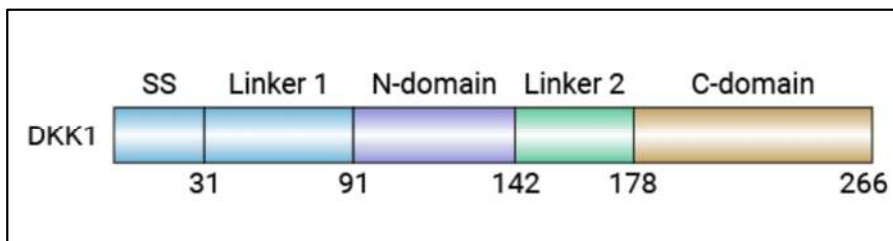
Kadar AFP normal adalah 0-20 ng/mL dan dapat meningkat > 200 ng/mL serta dapat digunakan untuk mendiagnosis HCC. Pasien HCC mengalami peningkatan kadar AFP sekitar 60%-70%. Sejak tahun 1970an, AFP telah digunakan sebagai penanda tumor untuk diagnosis HCC. Serum AFP masih dianggap sebagai penanda serum paling penting untuk diagnosis HCC saat ini, meskipun serum AFP dapat tinggi pada beberapa penyakit hati non-kanker. Serum AFP tidak hanya memiliki nilai diagnostik tetapi juga memiliki nilai prediktif untuk prognosis HCC. Selain itu, tingkat AFP serum

yang tinggi telah dikaitkan dengan ukuran tumor yang lebih besar, keterlibatan bilobar, tumor tipe difus dan trombus tumor vena porta. Namun, tidak ada korelasi yang konsisten yang telah ditetapkan antara tingkat AFP serum dan stadium tumor, derajat diferensiasi tumor atau metastasis ekstrahepatik (Spear,BT 2017).

### 1.2.3 *Dickkopf Related Protein 1 (DKK 1)*

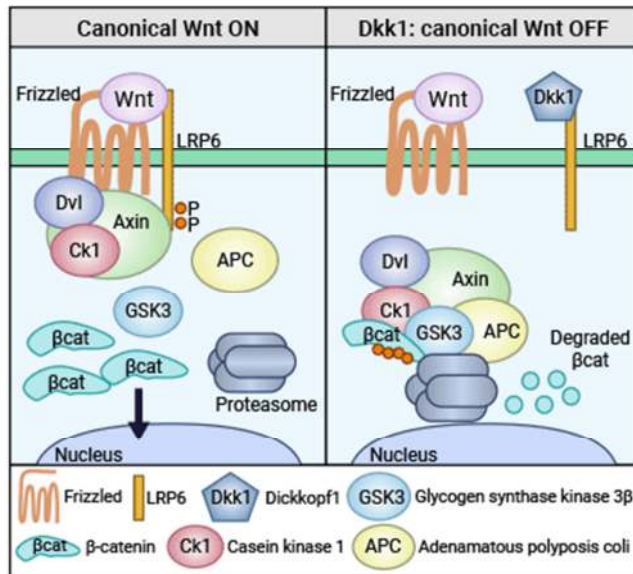
*Dickkopf Related Protein 1 (DKK1)* merupakan protein penghambat jalur pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin (Kikuchi A, *et al.* 2021). Banyak penelitian telah melaporkan bahwa DKK 1 diekspresikan secara tidak normal pada sel tumor. Oleh karena perbedaan lingkungan tumor dan mekanisme pengaturan yang kompleks pada masing-masing tumor, DKK 1 memiliki efek berbeda pada perkembangan tumor yang berbeda. Pada banyak tumor, ekspresi DKK 1 yang tinggi dapat mendorong metastasis tumor. Semakin banyak bukti menunjukkan bahwa DKK 1 memainkan peran yang kompleks, perkembangan dan metastasis di lingkungan tumor yang berbeda (Fezza M, *et al.* 2022).

*Dickkopf Related Protein 1* ditemukan pada tahun 1998. *Dickkopf Related Protein 1* ialah glikoprotein sekretori dengan dua domain yang dilestarikan kaya akan sistein. Panjang penuh gen DKK 1 manusia berukuran 1815kb dan terletak pada kromosom 10q11.2.26. Protein DKK 1 terdiri dari 266 asam amino dan berat molekul relatifnya sekitar 29 kDa. Protein DKK-2, DKK-3 dan DKK-4 mempunyai persamaan urutan pada vertebrata. DKK-2 dan DKK-4 sama-sama dapat menghambat persinyalan Wnt namun tidak sekuat DKK 1 serta berbeda dengan DKK-3 belum jelas fungsinya. Struktur DKK1 mencakup urutan pensinyalan N-terminal, dua wilayah kaya sistein dan situs N-glikosilasi di dekat ujung C (Gambar 9) (Chu, Hang Yin, *et al.* 2021).



Gambar 9. Struktur *Dickkopf Related Protein 1*.(Chu, Hang Yin, *et al.* 2021)

Peptida DKK 1 terlokalisasi di retikulum endoplasma dan disekresi secara ekstraseluler melalui urutan sinyal asam amino 20-30. Daerah lipatan cofilinnya, dengan tumpukan  $\beta$  pendek dan ikatan disulfida, berinteraksi dengan reseptor Wnt LRP5/LRP6 dan protein penembus membran Kremen 1/2, menginduksi endositosis dan menghambat jalur pensinyalan Wnt (Gambar 10). *Dickkopf Related Protein 1* diekspresikan di berbagai jaringan dan tipe sel, seperti prostat, liver, ginjal serta adiposa (Zhu, Guohua, *et al.* 2021). DKK 1 ditemukan meningkat pada penyakit *multiple myeloma* (Fezza M, *et al.* 2022).



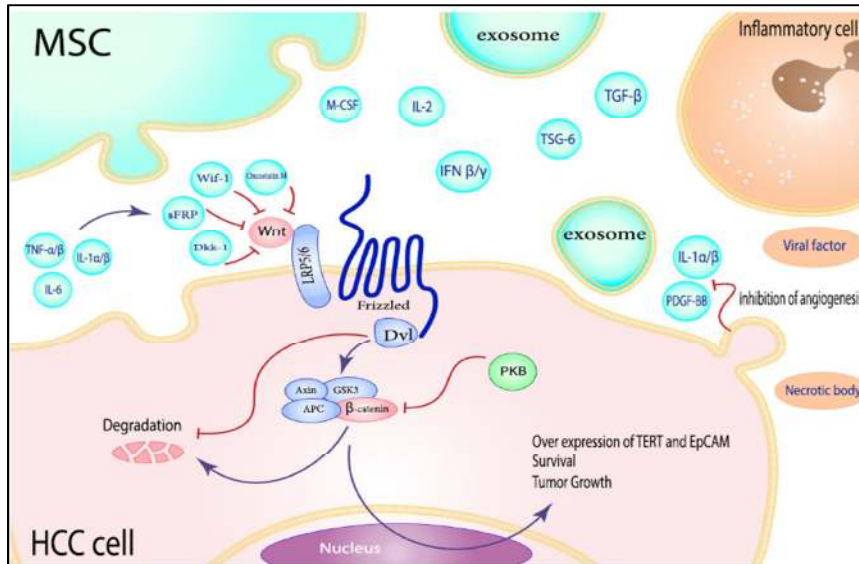
Gambar 10. Jalur pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin oleh DKK 1. (Zhu, Guohua, *et al.* 2021)

*Dickkopf Related Protein 1* memainkan peran penting dalam berbagai penyakit melalui jalur pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin. DKK 1 tidak diekspresikan pada jaringan normal tetapi pada tumor menunjukkan ekspresi yang berbeda dalam berbagai kondisi. DKK 1 bertindak sebagai gen pro-karsinogenik pada multiple myeloma, karsinoma hepatoseluler, kanker paru-paru non-sel kecil dan kanker pankreas. (Chu, Hang Yin, *et al.* 2021) Menariknya, pada penelitian sebelumnya oleh Anne Olbrigh dkk tahun 2022, level DKK 1 terdeteksi sebelum dan selama *Transarterial Chemoembolization* (TACE) pada pasien Asia (Olbrigh A, *et al.* 2022).

Seperti yang telah dibahas di atas bahwa DKK 1 merupakan gen pro-karsinogenik pada HCC. Perubahan pada pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin terbukti memainkan peran penting dalam pengembangan HCC. Antagonis Wnt yang disekresikan memainkan peran penting dalam regulasi pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin. Protein yang berperan antaranya, dickkopf-1 (DKK 1) merupakan anggota prototipe dan dikenal sebagai antagonis kuat pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin (Fezza M, *et al.* 2022). Telah dilaporkan bahwa DKK 1 mengalami penurunan regulasi pada tumor usus besar manusia, menunjukkan bahwa DKK 1 dapat bertindak sebagai penekan tumor. Lebih lanjut, penelitian terbaru melaporkan peningkatan ekspresi DKK 1 pada pasien HCC tahap awal dan terus meningkat pada HCC yang memiliki prognosis buruk. Semua penelitian ini menunjukkan bahwa DKK 1 berhubungan dengan pertumbuhan tumor dan prognosis buruk pada HCC (Zekri AR, *et al.* 2020).

Jalur pensinyalan Wnt/ $\beta$ -catenin memainkan peran penting dalam perkembangan karsinogenesis hati dan perkembangan sel hati yang normal (Suda T, *et al.* 2022). Terdapat penelitian sebelumnya juga menyatakan adanya peningkatan bertahap dalam kadar DKK 1 serum dari pasien sirosis terkait virus hepatitis B (HBV) yang berkembang menjadi HCC pada tahap awal. Selain itu, kadar DKK 1 serum pada pasien HCC dengan sirosis secara signifikan lebih tinggi dibandingkan pada pasien

hanya dengan sirosis. Diketahui bahwa keakuratan diagnostik AFP untuk HCC tahap awal memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Jeng et al tahun 2020 mengatakan bahwa akurasi diagnostik DKK1 pada HCC soliter kecil (ukuran  $\leq 2$  cm) menunjukkan peningkatan dibandingkan dengan AFP ketika menggunakan semua subjek non-HCC sebagai kontrol (Jeng J, *et al.* 2020).



Gambar 11. Mekanisme yang mendasari peran DKK1 dalam perkembangan HCC. (Ai J, *et al.* 2020)

Mekanisme skematis jalur pensinyalan Wnt pada HCC belum sepenuhnya diketahui. Pada banyak teori menyebutkan bahwa pada HCC terjadi peradangan kronik sel-sel hati dan mutasi gen yang bisa menyebabkan persinyalan intraseluler menuju nukleus terjadi terganggu. Referensi lainnya juga menyebutkan bahwa virus Hepatitis B yang menjadi etiologi terbanyak dari HCC menjadi awal terbentuknya gen-gen yang bersifat protoonkogen menjadi onkogen bersifat ganas. Oleh karena proses tersebut, maka DKK 1 yang *over* ekspresi pada sel-sel HCC dapat mengganggu proses intraseluler sehingga terjadi proliferasi sel-sel ganas (Tung EK, Mak CK, Fatima S, *et al.* 2022). Ekspresi DKK 1 meningkat pada sel hepar yang mengalami kerusakan kemudian DKK 1 tersebut akan menghambat jalur persinyalan Wnt sehingga berikatan dengan LRP 5/6 kemudian menyebabkan degradasi  $\beta$ catenin dan ada juga yang akan mengaktifasi persinyalan ke nukleus sehingga terjadi pertumbuhan dan perkembangan sel-sel HCC (*tumor growth*) dan ekspresi *Telomerase reverse transcriptase* (TERT) serta *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) berlebihan. Hal ini terjadi dalam kondisi lingkungan sel-sel yang mengalami inflamasi. (Watany M, *et al.* 2023) Persinyalan Wnt merupakan salah satu jalur yang bertindak dalam proliferasi sel, pertumbuhan dan perkembangan sel. Ketika proses peradangan terjadi DKK 1 akan mengaktifkan jalur ini dengan berikatan dengan reseptor frizzled dan LRP5/6. Hal ini akan memodulasi inisiasi pensinyalan Wnt (Gambar 11) (Ai J, *et al.* 2020).

Berbagai macam penyebab, seperti virus dan lingkungan, dapat menyebabkan HCC. Sekitar 78.200 kasus baru yang dikonfirmasi dilaporkan setiap tahunnya. Tingkat kelangsungan hidup 5 tahun pasien HCC bervariasi dari tahap ke tahap, berkisar antara 50% hingga 75% pada tahap awal, sedangkan tingkat kelangsungan hidup 5 tahun pada pasien HCC dengan metastasis jauh berkurang menjadi 3%. Dalam praktik klinis, serum Alpha-Fetoprotein (AFP) dan USG telah banyak digunakan dalam skrining dini HCC. Namun, ketika AFP berada kadar minimal 20 ng/mL, sensitivitasnya berkurang menjadi 53% dan spesifisitasnya 90%. Oleh karena itu, para peneliti sebelumnya tidak langsung mendiagnosis kanker hati karena sensitivitasnya yang buruk. Penelitian ini membandingkan kadar DKK 1 serum dari 831 kelompok uji peserta dengan 453 peserta sebagai kontrol, dan mRNA DKK 1 jaringan hati serta kadar protein pasien HCC dan pasien non-kanker, Profesor Qin Wenxin menemukan bahwa DKK 1 dapat melengkapi pengukuran AFP dalam diagnosis HCC, selain itu meningkatkan perbedaan pasien HCC negatif-AFP, dan membedakan HCC dari penyakit hati kronis non-maligna (Zhu, Guohua, *et al.* 2021).

Bukti sebelumnya menunjukkan bahwa DKK 1 berperan dalam angiogenesis selama tumorigenesis dan peradangan. (Chu, Hang Yin, *et al.*, 2021) Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa DKK 1 berhubungan dengan aktivasi endotel vaskular seperti reseptor faktor pertumbuhan 2 (VEGFR2), sedangkan ekspresi  $\beta$ -catenin dan GSK3  $\beta$  tidak berubah secara signifikan, menunjukkan bahwa DKK 1 dapat menginduksi angiogenesis dengan mengatur VEGFR2 secara independen dari jalur transduksi sinyal Wnt pada HCC (Kim, S, U *et al.* 2024).

### 1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

Bagaimana kadar *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* pada penderita *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*?

### 1.4 Tujuan Penelitian

#### 1.4.1 Tujuan Umum

Mengetahui kadar *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* pada pasien *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*.

#### 1.4.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui kadar *Dickkopf Related Protein 1* pada penderita *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*.
- b. Mengetahui kadar *Alpha-Fetoprotein* pada pasien *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*.
- c. Mengetahui hubungan *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* pada pasien *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*.
- d. Menentukan *cut off Dickkopf Related Protein 1* setiap stadium menurut *Barcelona Clinic Liver Cancer* pada pasien *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*.

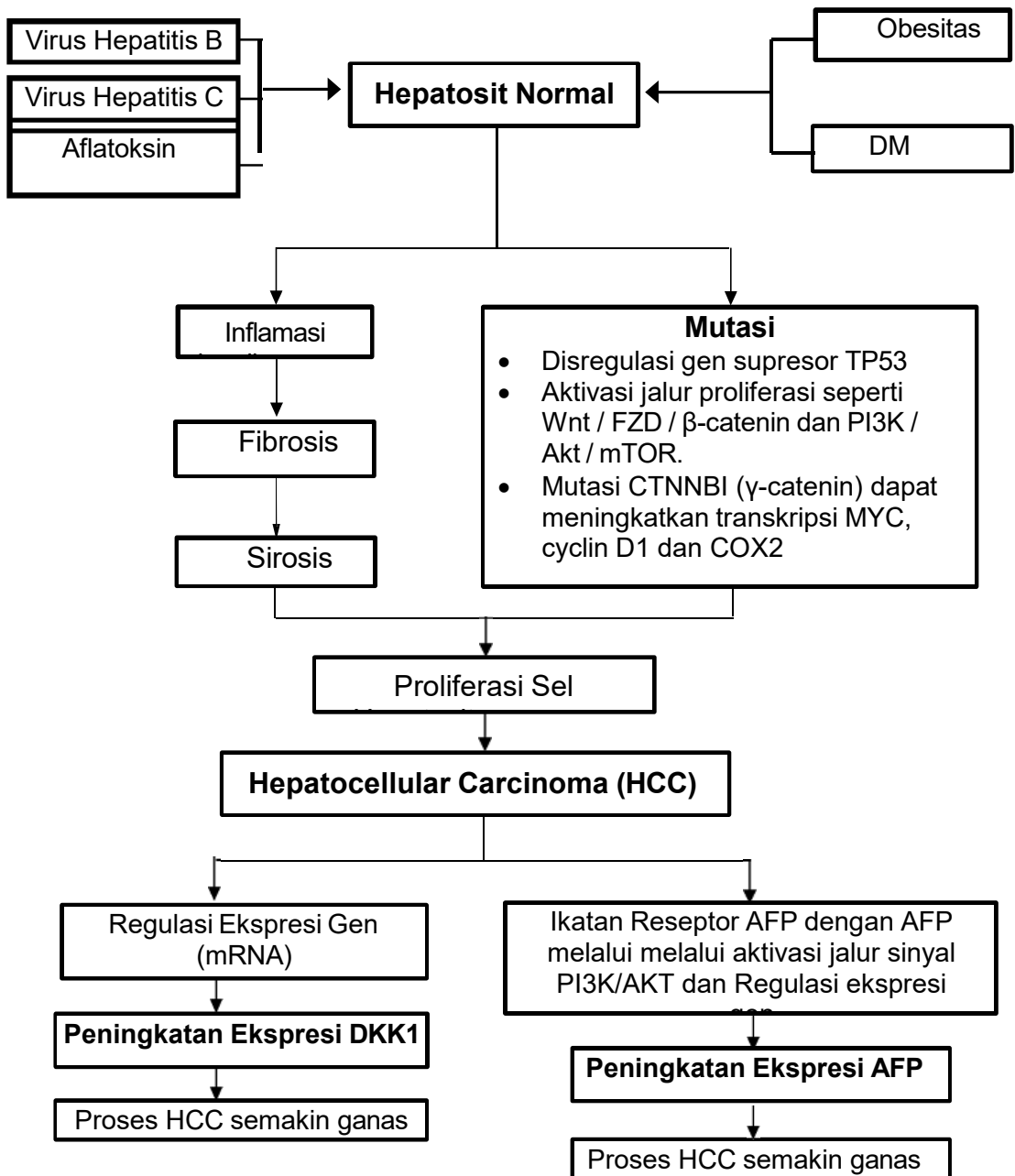
## 1.5 Hipotesis

Terdapat perbedaan kadar *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* pada penderita *Hepatocellular Carcinoma* berdasarkan stadium *Barcelona Clinic Liver Cancer*.

## 1.6 Manfaat Penelitian

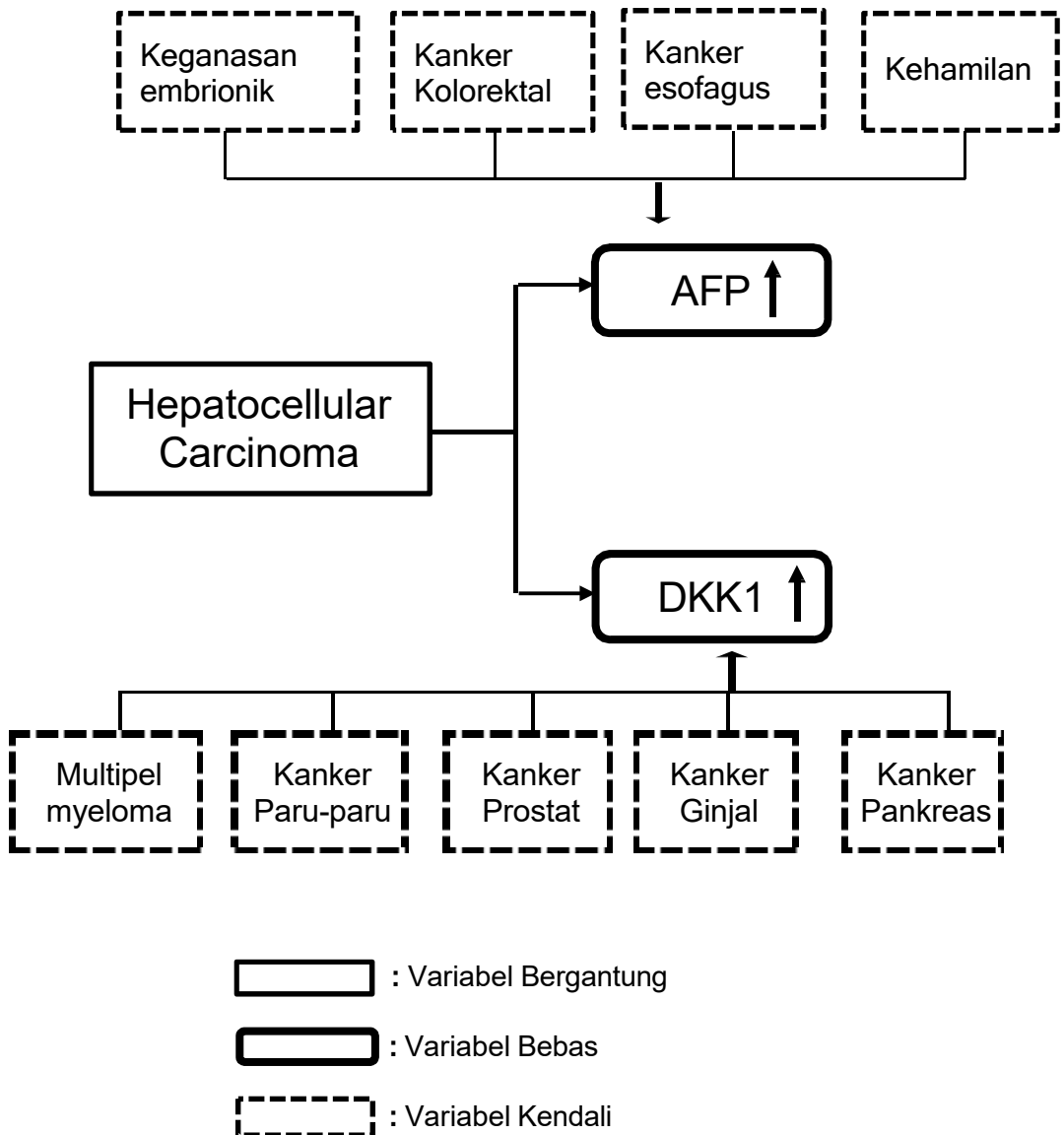
- a. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* pada pasien *Hepatocellular Carcinoma*.
- b. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang hubungan *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* pada patogenesis pasien *Hepatocellular Carcinoma*.
- c. Hasil penelitian diharapkan dapat memberi informasi bagi klinisi tentang peranan *Dickkopf Related Protein 1* dan *Alpha-Fetoprotein* sebagai salah satu penanda dari *Hepatocellular Carcinoma*.
- d. Menjadi bahan acuan dan pembandingan bagi penelitian selanjutnya dengan menggunakan biomarker *Hepatocellular Carcinoma* lainnya.

## 1.7 Kerangka Teori



Keterangan : TP53; Tumor Protein 53,

## 1.8 Desain Konseptual



Keterangan : AFP; Alpha-Fetoprotein, DKK1; Dickkopf-Related Protein

## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional*.

### 2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 2.2.1 Tempat Penelitian

- a. Instalasi Laboratorium RS Wahidin Sudirohusodo Makassar untuk pengambilan sampel dan data penelitian.
- b. *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) dan Laboratorium Penelitian RS Universitas Hasanuddin untuk pemeriksaan sampel

#### 2.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Februari 2025 hingga Mei 2025

### 2.3 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah pasien yang telah didiagnosis *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) oleh klinisi di poli *Gastroenterohepatology Center* dan ruang perawatan inap RS Wahidin Sudirohusodo Makassar berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium dan pemeriksaan radiologi.

### 2.4 Sampel dan Cara Pengambilan Sampel

Sampel penelitian adalah semua populasi yang terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian. Pengumpulan sampel dilakukan dengan cara *consecutive sampling* yaitu semua pasien yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam sampel penelitian sampai besar sampel yang diperlukan terpenuhi.

### 2.5 Perkiraan Besar Sampel

Penentuan besarnya sampel menggunakan rumus perkiraan korelasi. Korelasi dua variable (R)

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{0,25 \left[ \ln \frac{1+R}{1-R} \right]^2} + 3$$

$\beta$	$Z_{\beta}$	n
0,01	2,32	64
0,05	1,64	46
0,10	1,28	38
0,15	1,03	33
0,20	0,84	29

Keterangan:

R : koefisien korelasi minimal yang dianggap bermakna (adareferensi)  
 $Z\alpha$  : Nilai standar deviasi Alfa (1,96)  $Z\beta$  : Nilai standar deviasi Beta (0.84)

Jika nilai R tidak ada referensi, maka digunakan 0,500 (korelasi minimal yang dianggap bermakna) Kesalahan tipe I ditetapkan sebesar 5% sehingga nilai  $Z\alpha = 1,96$  Dari rumus dan kesalahan tipe II ditetapkan sebesar 20% sehingga nilai  $Z\beta = 0,84$  dari rumus dan tabel diatas didapatkan jumlah sampel minimum (n) adalah 30 sampel

## 2.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

### 2.6.1 Kriteria Inklusi

Penderita yang telah didiagnosis HCC oleh klinisi di *Gastroenterohepatology Center* RS Wahidin Sudirohusodo Makassar berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium dan pemeriksaan radiologi.

### 2.6.2 Kriteria Eksklusi

- Memiliki penyakit keganasan primer lainnya seperti keganasan embrionik, gastrointestinal, paru, pankreas, prostat, dan *multiple myeloma*.
- Sampel serum lipemik atau hemolisis dan tidak memungkinkan untuk pengambilan sampel ulang

## 2.7 Izin Penelitian dan *Ethical Clearance*

Dalam pelaksanaan penelitian ini, setiap tindakan dilakukan atas izin dan sepengetahuan penderita yang dijadikan sampel penelitian melalui lembar *informed consent* dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin - RS Universitas Hasanuddin - RS Wahidin Sudirohusodo Makassar dan jejaring dengan *Ethical Clearance* nomor : 127 / UN4.6.8.4.5.31/ PP36 /2025

## 2.8 Teknik Pengumpulan Data

### 2.8.1 Alokasi Subyek

Penelitian dilakukan pada orang dewasa yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia menjalani prosedur penelitian

### 2.8.2 Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini dilaksanakan dengan beberapa tahap sebagai berikut:

- Identitas dan hasil AFP dicatat saat penderita pertama kali masuk yang memenuhi kriteria inklusi kemudian diberikan penjelasan lengkap mengenai tujuan penelitian kepada pasien dan keluarga, jika setuju selanjutnya *informed consent* diisi dan ditanda tangan.
- Serum penderita saat pertama kali masuk diambil, lalu diperiksa kadar DKK 1
- Pemeriksaan kadar DKK 1 serum dilakukan di *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) dan Laboratorium Penelitian RS Universitas Hasanuddin dengan kit ELISA.

## 2.9 Prosedur Pemeriksaan Kadar DKK 1

### 1. Pra analitik

- a. Persiapan penderita  
Tidak ada persiapan khusus.
- b. Persiapan sampel

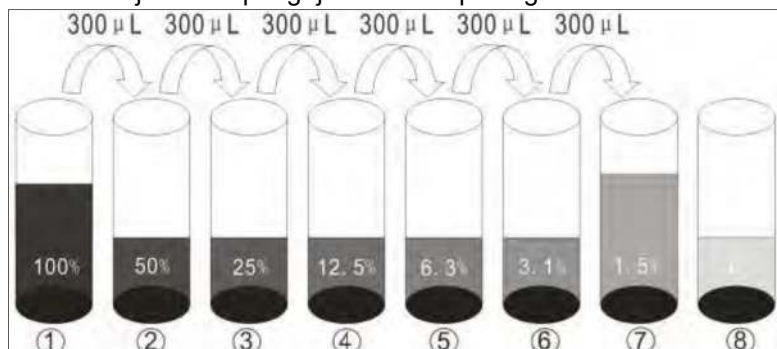
Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah serum yang diperoleh dari prosedur flebotomi. Sampel dari tabung tanpa antikoagulan dibiarkan menggumpal selama 2 jam pada suhu kamar atau 24 jam pada suhu 4°C sebelum disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatan dikumpulkan untuk dilakukan pengujian. Sampel serum disimpan pada suhu -20°C.

### c. Alat dan bahan

- 1) Alat: inkubator, *plate shaker*, *microplate reader* dengan filter 450 nm, mikropipet, *assay plate*, tip pipet mikro, *tube disposable*, kertas *absorbent*, *Microelisa stripplate*.
- 2) Bahan: serum, air suling, larutan standar, reagen DKK 1

### d. Persiapan Reagen dan Standar

- 1) Keluarkan kit ELISA dari lemari es 20 menit sebelum digunakan.
- 2) Encerkan *wash buffer* pekat dengan air suling (1:25).
- 3) Tambahkan 1,0 mL pengencer standar ke dalam botol standar terliofilisasi dan diamkan selama 30 menit. Setelah standar benar-benar larut, campurkan sedikit dan tandai dengan label pada tabung. Direkomendasikan untuk menggunakan nilai konsentrasi berikut ini untuk kurva standar: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 ng/mL. Catatan: pastikan standar terliofilisasi benar-benar larut dan tercampur rata.
- 4) Metode pengenceran sampel standar: ambil 7 tabung bersih dan beri label dengan konsentrasi yang diharapkan (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0 ng/mL). Tambahkan 300  $\mu$ L pengencer standar ke dalam setiap tabung. Pipet 300  $\mu$ L pengencer dari standar yang dilarutkan dan tambahkan ke tabung berlabel 5 ng/mL dan aduk rata. Selanjutnya pipet 300  $\mu$ L pengencer dari tabung 5ng/mL dan tambahkan ke tabung 2,5ng/mL dan aduk rata. Ulangi langkah-langkah ini melalui standar 0,156ng/mL. Pengencer standar dalam tabung 0 ng/mL adalah kontrol negatif. Catatan: larutan standar yang telah dilarutkan harus dibuang setelah menjalankan pengujian tidak dapat digunakan kembali.



- 5) Antibodi biotinylation: keluarkan volume larutan *Biotinylated Antibody* yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji dan encerkan dengan

pengencer antibodi dengan proporsi 1:100. Siapkan 30 menit sebelumnya dan direkomendasikan untuk tidak menggunakan kembali untuk pengujian tambahan.

- 6) Enzim konjugat: buang larutan enzim konjugat dalam jumlah yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji dan encerkan dengan enzim *diluent* dalam proporsi 1:100. Siapkan 30 menit sebelumnya dan disarankan untuk tidak menggunakan kembali untuk pengujian tambahan.
- 7) Reagen warna: siapkan larutan reagen warna 30 menit sebelumnya dengan menambahkan reagen warna A dan reagen warna B dengan proporsi 9:1.

## 2. Analitik

### a. Prinsip tes

Pemeriksaan ini menggunakan teknik *Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Antibodi yang dilapisi sebelumnya adalah antibodi monoklonal anti-Human *Dickkopf Related Protein 1* (DKK1), sedangkan antibodi deteksi adalah antibodi poliklonal terbiotinilasi. Sampel dan antibodi terbiotinilasi ditambahkan ke dalam sumur pelat ELISA dan dicuci dengan PBS atau TBS setelah penambahan masing-masing ke sumur. Kemudian konjugat Avidin-peroksidase ditambahkan ke sumur setelahnya. Substrat TMB digunakan untuk pewarnaan setelah konjugat enzim telah dicuci bersih dari sumur dengan PBS atau TBS. TMB bereaksi membentuk produk biru dari aktivitas peroksidase, dan akhirnya berubah menjadi kuning setelah penambahan larutan penghenti (Reagen Warna C). Intensitas warna dan kuantitas analit target dalam sampel berkorelasi positif. Baca *optical density* (OD) absorbansi pada 450nm dalam *microplate reader*, dan kemudian konsentrasi target dapat dihitung.

### b. Cara kerja

- 1) Keluarkan strip sesuai jumlah yang dibutuhkan, biarkan pada suhu ruangan.
- 2) Siapkan sumur kosong.
- 3) Tambahkan standar atau sampel ke dalam sumur yang sesuai (100  $\mu$ L untuk setiap sumur). Tutup sumur/piring dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
- 4) Siapkan sejumlah *Biotinylated Antibody* yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
- 5) Cuci pelat ELISA 2 kali.
- 6) Tambahkan antibodi biotinilasi yang telah disiapkan ke setiap sumur (100  $\mu$ L per sumur). Tutup sumur reaksi dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
- 7) Siapkan sejumlah enzim konjugat yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
- 8) Cuci pelat ELISA 3 kali.
- 9) Tambahkan enzim konjugat yang telah disiapkan ke setiap sumur selain sumur kosong (masing-masing 100  $\mu$ L). Tutup sumur dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

- 10) Cuci pelat ELISA 5 kali.
  - 11) Tambahkan 100  $\mu$ L reagen warna yang telah disiapkan ke dalam masing-masing sumur (juga ke dalam sumur kosong), inkubasi terlindung dari cahaya pada suhu 37°C. Ketika warna dari standar tertinggi menjadi lebih gelap dan gradien warna muncul, inkubasi dapat dihentikan. Reaksi kromogenik harus dikontrol dalam waktu 30 menit.
  - 12) Tambahkan 100  $\mu$ L reagen warna C ke masing-masing sumur (juga ke dalam sumur kosong). Aduk rata. Baca *Optical Density* (OD) pada 450 nm dalam waktu 10 menit.
3. Paska analitik
- Menurut konsentrasi standar dan nilai OD yang sesuai, untuk menghitung persamaan regresi linier dari kurva standar. Kemudian sesuai dengan nilai OD sampel, menghitung konsentrasi sampel yang sesuai.
- Batas Linearitas : 0.16 – 10 ng/mL

## 2.10 Definisi operasional dan Kriteria Objektif

- a. Penderita HCC adalah semua penderita yang didiagnosis *Hepatocellular Carcinoma* oleh klinisi di *Gastroenterohepatology Center* RS Wahidin Sudirohusodo Makassar berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan Radiologi berupa USG abdomen/ CT Scan abdomen 3 fase/ MRI dan peningkatan kadar AFP >200 ng/mL di RS Wahidin Sudirohusodo Makassar.  
Stadium BCLC  
BCLC A: HCC dengan stadium tumor tunggal atau 2-3, berukuran < 3 cm tanpa invasi vascular dengan atau tanpa gejala.  
BCLC B: HCC dengan stadium tumor multinodul berukuran > 3 cm, tanpa invasi vaskular / terdapat invasi makrovaskular  
BCLC C: HCC dengan stadium dengan gejala tumor, terdapat invasi makrovaskular dan atau metastasis ekstrahepatik.  
BCLC D: stadium HCC yang sudah mengalami tahap akhir dari suatu keganasan, terdapat invasi makrovaskular dan metastasis ekstrahepatik
- b. *Alpha-Fetoprotein* ialah kadar AFP yang datanya didapat dari rekam medis penderita HCC berasal dari RS Wahidin Sudirohusodo Makassar atau rumah sakit jejaring lainnya. Pemeriksaan menggunakan sampel serum yang diperiksa dengan metode *Chemiluminescent Mikroparticle immunoassay* (CMIA ) dengan nilai rujukan (0.89 – 8.78 ng/mL). Kadar AFP untuk diagnosis HCC adalah  $\geq 200$  ng/mL.
- c. *Dickkopf Related Protein 1* (DKK1) adalah protein dalam sampel serum penderita yang diukur dengan metode ELISA menggunakan Human Dickkopf Related Protein 1 (DKK 1) Kit Lot # 30375463 Kit from MybioSource (San Diego, California, USA). Hasil dinyatakan dalam satuan ng/mL.
- d. Penyakit keganasan primer lain adalah semua penyakit keganasan primer selain HCC yang didiagnosis oleh klinisi RS Wahidin Sudirohusodo Makassar yang tertera di dalam rekam medis pasien.

## 2.11 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dikelompokkan sesuai tujuan dan jenis data, kemudian dianalisis dengan metode statistik yang sesuai menggunakan SPSS sebagai berikut:

1. Perhitungan statistik deskriptif yaitu nilai minimum, maksimum, mean dan standar deviasi untuk variabel data numerik.
2. Analisis bivariat dan multivariat diuji menggunakan *Kruskall-Wallis test*, *Least Significant Difference (LSD)* dan *Spearman's Correlation test*. Hasil uji hipotesis disajikan dalam bentuk tabel, diagram dan narasi. Hasil uji dinyatakan sebagai tidak bermakna apabila diperoleh nilai  $p > 0,05$  dan bermakna jika  $p \leq 0,05$ .

## 2.12 Skema Alur Penelitian

