

BAB I

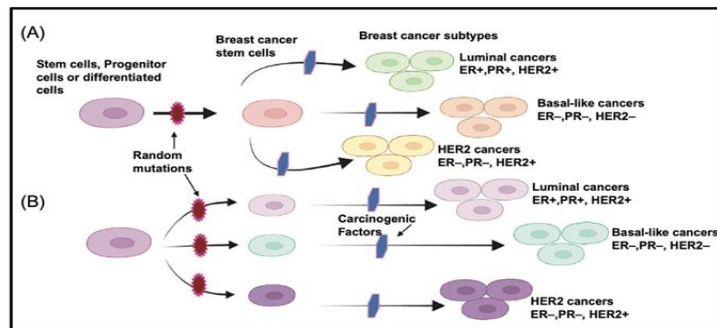
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker payudara merupakan salah satu keganasan yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia. Data epidemiologi menunjukkan bahwa kanker payudara menyumbang sekitar 15% dari seluruh kasus kanker baru, dengan prevalensi tertinggi pada wanita berusia 30–59 tahun. Penyakit ini juga menjadi penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita berusia di atas 45 tahun, setelah kanker paru-paru (Muhsin et al., 2023; Shao X et al., 2017). Menurut laporan Globocan tahun 2018, insiden kanker payudara di Indonesia mencapai 58.256 kasus, atau sekitar 30,9% dari seluruh kasus kanker baru yang terdiagnosis (Harjianti T et al., 2023).

Kanker payudara adalah keganasan pada jaringan payudara yang dapat berasal dari epitel duktus maupun lobulus (PERABOI, 2020; Kemenkes, 2018). Kanker payudara invasif ditandai dengan penetrasi membran basal oleh sel-sel ganas sehingga menyerang stroma (jaringan penunjang payudara yang terdiri atas jaringan ikat, lemak, pembuluh darah, pembuluh limfatik serta sel-sel imun) sekitarnya. Proses invasi atau infiltrasi pada dinding duktus memungkinkan sel tumor memperoleh akses ke pembuluh limfatik dan pembuluh darah yang mengelilingi area tersebut (Townsend et al., 2022).

Karsinogenesis pada payudara pada dasarnya memiliki mekanisme yang serupa dengan karsinogenesis pada keganasan epitel lainnya. Salah satu peristiwa awal yang penting adalah inaktivasi gen penekan tumor yang berperan dalam menjaga stabilitas genetik serta gen yang berfungsi dalam perbaikan *deoxyribonucleic acid* (DNA), sehingga terjadi akumulasi perubahan genetik. Kondisi ini mengganggu mekanisme pengendalian siklus sel maupun jalur sinyal apoptosis yang pada akhirnya menimbulkan ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis sel (Henry M. Kuerer, 2010).



Gambar 1. Teori inisiasi dan perkembangan kanker payudara (Ahmad, 2022)

Ada dua teori yang untuk inisiasi dan perkembangan kanker payudara. (A) Teori *cancer stem cell*, yaitu semua subtype tumor berasal dari sel induk atau sel progenitor yang identik. Proses transformasi spesifik subtype kemudian menghasilkan morfologi tumor yang berbeda. (B) Teori *stochastic*, yaitu setiap subtype tumor berkembang dari jenis sel yang unik (sel induk, sel progenitor, atau sel yang terdiferensiasi). Mutasi acak yang terjadi pada sel payudara, akhirnya mengubah sel normal menjadi sel tumor ketika sudah cukup banyak mutasi yang terjadi. Terlepas dari kenyataan bahwa kedua teori tersebut didukung oleh bukti-bukti ilmiah, belum ada yang dapat menjelaskan dengan tepat asal mula kanker payudara manusia (Ahmad, 2022).

Diagnosis kanker payudara didasarkan pada *triple assessment* yang meliputi pemeriksaan fisik, pencitraan (mammografi atau USG) dan biopsi. Penentuan stadium kanker payudara dilakukan berdasarkan sistem klasifikasi Tumor Nodul Metastase (TNM) *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) 2018 Edisi 8 untuk kanker payudara. Perubahan besar pada edisi ini dalam penentuan stadium kanker payudara yaitu penambahan tingkat tumor, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2), *Estrogen Receptor* (ER), *Progesterone Receptor* (PR) dan tes genom sebagai elemen yang diperlukan untuk menentukan stadium bersama dengan informasi anatomi pada kategori tumor (T), kelenjar getah bening (N) dan metastasis jauh (M). Perubahan besar lainnya adalah karsinoma lobular in situ atau neoplasia lobular tidak termasuk dalam sistem *staging* ini. (Tabel 1) (Zhu and Doğan, 2021).

Tabel 1. Klasifikasi Sistem TNM berdasarkan *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) Edisi 8

Tumor primer (T)	
Tx	Tumor primer tidak dapat dinilai
T0	Tidak ada bukti tumor primer
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
Tis (DCIS)	<i>Ductal carcinoma in situ</i>
Tis (LCIS)	<i>Lobular carcinoma in situ</i>
Tis (Paget's)	<i>Paget's disease</i>
T1	Diameter terbesar tumor ≤ 20 mm
T1mi	Diameter terbesar tumor ≤ 1 mm
T1a	Diameter terbesar tumor > 1 mm tetapi ≤ 5 mm
T1b	Diameter terbesar tumor > 5 mm tetapi ≤ 10 mm
T1c	Diameter terbesar tumor > 10 mm tetapi ≤ 20 mm
T2	Diameter terbesar tumor > 20 mm tetapi ≤ 50 mm
T3	Diameter terbesar tumor > 50 mm
T4	Ukuran tumor berapapun dengan ekstensi langsung ke dinding dada dan/atau kulit

Kelenjar limfe regional (N)	
Nx	Kelenjar limfe regional tidak dapat dinilai
N0	Tidak ada metastasis ke kelenjar limfe regional
N1	Metastasis ke kelenjar limfe aksilla ipsilateral yang masih dapat digerakkan
N2	Metastasis ke kelenjar limfe aksilla ipsilateral yang sulit digerakkan
N3	Metastasis ke kelenjar limfe infraklavikular atau supraklavikular
Metastasis (M)	
M0	Tidak ditemukan metastasis jauh secara klinis atau radiografik
cM0(i+)	Tidak ditemukan metastasis jauh secara klinis atau radiografik tetapi ditemukan sel tumor di darah, sumsum tulang, atau tempat lain secara molekular atau mikroskopik dengan tanpa gejala atau tanda metastasis
M1	Ditemukan metastasis jauh

(Zhu and Doğan 2021)

Penentuan stadium klinis kanker payudara dilakukan setelah diperoleh klasifikasi berdasarkan sistem TNM (Tabel 2).

Tabel 2. Stadium Klinis Berdasarkan Klasifikasi Sistem TNM

Tumor primer (T)	
Tx	Tumor primer tidak dapat dinilai
T0	Tidak ada bukti tumor primer
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
Tis (DCIS)	<i>Ductal carcinoma in situ</i>
Tis (LCIS)	<i>Lobular carcinoma in situ</i>
Tis (Paget's)	<i>Paget's disease</i>
T1	Diameter terbesar tumor ≤ 20 mm
T1mi	Diameter terbesar tumor ≤ 1 mm
T1a	Diameter terbesar tumor > 1 mm tetapi ≤ 5 mm
T1b	Diameter terbesar tumor > 5 mm tetapi ≤ 10 mm
T1c	Diameter terbesar tumor > 10 mm tetapi ≤ 20 mm
T2	Diameter terbesar tumor > 20 mm tetapi ≤ 50 mm
T3	Diameter terbesar tumor > 50 mm
T4	Ukuran tumor berapapun dengan ekstensi langsung ke dinding dada dan/atau kulit
Kelenjar limfe regional (N)	
Nx	Kelenjar limfe regional tidak dapat dinilai
N0	Tidak ada metastasis ke kelenjar limfe regional
N1	Metastasis ke kelenjar limfe aksilla ipsilateral yang masih dapat digerakkan
N2	Metastasis ke kelenjar limfe aksilla ipsilateral yang sulit digerakkan
N3	Metastasis ke kelenjar limfe infraklavikular atau supraklavikular
Metastasis (M)	
M0	Tidak ditemukan metastasis jauh secara klinis atau radiografik
cM0(i+)	Tidak ditemukan metastasis jauh secara klinis atau radiografik tetapi ditemukan sel tumor di darah, sumsum tulang, atau tempat lain secara molekular atau mikroskopik dengan tanpa gejala atau tanda metastasis
M1	Ditemukan metastasis jauh

(Zhu and Doğan 2021)

Stadium penderita kanker payudara selanjutnya dapat dibagi menjadi stadium dini (stadium I, II A, II B) dan stadium lanjut (stadium III dan IV). Stadium lanjut dibagi menjadi stadium lanjut lokal (III A, III B, III C), dan stadium metastasis (IV). Stadium ini berguna dalam penentuan terapi dan prognosis penderita kanker payudara (PERABOI 2020; Zhu and Doğan, 2021).

Menurut AJCC *Breast Cancer* edisi 8, *grading* untuk kanker payudara juga bisa menggunakan *grading* histopatologi dan umumnya mengikuti sistem *Nottingham Histologic Score* atau *Scarff-Bloom-Richardson grading system* yaitu:

1. Grade I (*low grade / well-differentiated*)
2. Grade II (*intermediate grade / moderately differentiated*)
3. Grade III (*high grade / poorly differentiated*) (Harjianti T et al., 2023 ; AJCC 2018)

Kanker payudara merupakan neoplasma heterogen yang secara molekuler dibagi menjadi beberapa subtype utama, yaitu Luminal A, Luminal B, HER2-positif, dan *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC), berdasarkan ekspresi *estrogen receptor* (ER), *progesterone receptor* (PR), *human epidermal growth factor receptor-2* (HER2), serta marker proliferasi seperti Ki-67. Subtype Luminal A umumnya memiliki proliferasi rendah dan prognosis lebih baik, sedangkan Luminal B menunjukkan proliferasi lebih tinggi dan sifat yang lebih agresif. Subtype HER2-positif ditandai oleh overekspresi HER2 yang berhubungan dengan proliferasi sel tumor yang cepat dan prognosis lebih buruk, meskipun saat ini tersedia terapi target anti-HER2. *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC) merupakan subtype yang tidak mengekspresikan ER, PR, maupun HER2 dan umumnya memiliki agresivitas tinggi serta pilihan terapi yang lebih terbatas. Perbedaan karakteristik biologis antar subtype molekuler tersebut dapat memengaruhi perjalanan penyakit, respons terapi, serta ekspresi biomarker terkait metabolisme besi seperti hepsidin dan ferroportin (Herbeck N et al., 2022)

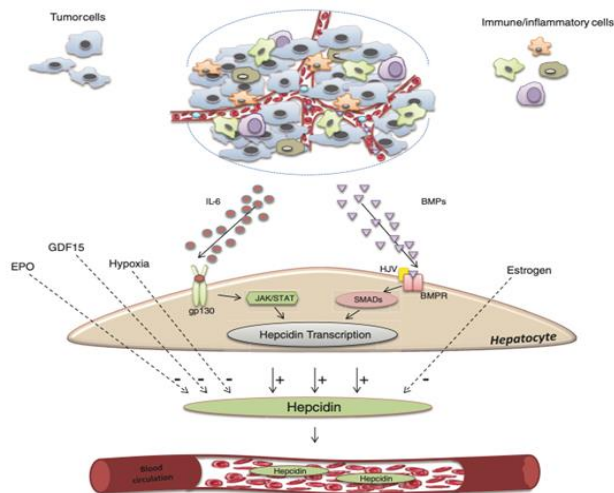
Zat besi merupakan mineral esensial yang memiliki beragam fungsi biologis, antara lain dalam transport oksigen, respirasi seluler, sintesis DNA dan regulasi sistem imun. Homeostasis besi dikendalikan secara ketat oleh hormon hepsidin melalui pengaturan ferroportin, sehingga keseimbangan kebutuhan fisiologis tetap terjaga dan toksisitas akibat kelebihan besi dapat dicegah (R. Elliott et al., 2012).

Dalam konteks kanker, kebutuhan zat besi meningkat karena perannya yang penting dalam pertumbuhan dan pembelahan sel, termasuk melalui regulasi metabolisme besi, konsumsi oksigen, sintesis DNA, serta mekanisme kematian sel. Deregulasi jalur hepsidin dan ferroportin dapat menyebabkan akumulasi besi intraseluler yang mempercepat proliferasi dan progresi tumor. Selain itu, kelebihan besi juga berkontribusi pada karsinogenesis melalui pembentukan radikal bebas. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa protein-protein pengatur besi berperan krusial pada berbagai tahap karsinogenesis, sehingga dapat dipertimbangkan sebagai penanda potensial progresi keganasan sekaligus target terapi antikanker. Di antara protein tersebut, hepsidin menempati peran utama (R. Elliott et al., 2012; Yalovenko et al., 2016; Pogribny IP, 2010).

Hepcidin adalah hormon peptide (25 amino acid) yang diproduksi terutama oleh hepatosit. Hepcidin adalah pengatur utama metabolisme besi sistemik, bekerja melalui pengikatan pada ferroportin dan memicu internalisasi serta degradasinya sehingga menghentikan ekspor besi dari sel ke sirkulasi (Xu Y et al., 2021).

Patomekanisme peningkatan hepcidin dalam plasma pasien kanker payudara ganas dipengaruhi oleh beberapa jalur regulasi. Peningkatan produksi hepcidin di hati ditentukan oleh interaksi antara status besi, aktivitas eritropoiesis, proses inflamasi serta kekuatan relatif dari masing-masing sinyal tersebut (Gambar 2). Induksi hepcidin sebagai respons terhadap inflamasi atau peningkatan kadar besi serum terutama berkaitan dengan sekresi sitokin *interleukin-6* (IL-6) oleh sel tumor serta dapat pula bergantung pada sinyal yang dimediasi oleh subset *bone morphogenetic protein* (BMP). Kadar hepcidin ditemukan lebih tinggi pada tumor payudara HER2-positif dan tingginya kadar IL-6 juga berkorelasi dengan overekspresi HER2. Beberapa penelitian melaporkan bahwa jalur sinyal BMP mengalami aktivasi berlebihan selama inisiasi dan progresi kanker payudara yang berkontribusi pada peningkatan populasi sel punca tumor serta terjadinya transisi epitel-mesenkimal (Orlandi R et al., 2014).

Data terbaru yang ditetapkan dalam model tikus mendukung konsep bahwa estrogen juga terlibat dalam memodulasi homeostasis besi dengan mengatur ekspresi hepcidin hati (Hou Y et al, 2012). Temuan-temuan mengenai efek estrogen pada metabolisme besi ini menjelaskan peningkatan akumulasi besi dalam kondisi defisiensi estrogen seperti gangguan menopause (Orlandi R et al., 2014).



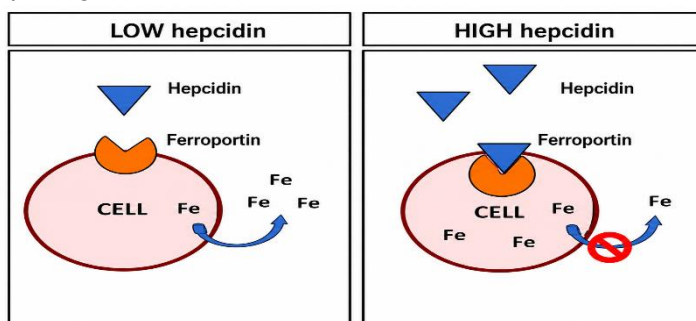
Gambar 2. Hubungan mekanistik tentang ekspresi hepcidin: sel tumor dan lingkungan mikro di sekitarnya seperti sel inflamasi, terutama makrofag, dapat menghasilkan berbagai faktor, termasuk IL-6 dan BMP. Mediator terlarut ini dapat memengaruhi tidak hanya sel tumor dan sel stroma yang terhubung tetapi juga dapat bertindak secara sistemik. Elemen pengikat SMAD yang responsif BMP dan elemen pengikat STAT3 yang responsif IL-6 dapat bekerja sama untuk secara positif mengatur transkripsi hepcidin di hati; sebaliknya, ekspresi hepcidin diatur secara negatif oleh EPO, sinyal eritropoietik atau hipoksia (Orlandi R et al., 2014).

Eksresi hepsidin telah terdeteksi pada tahap awal kanker payudara (Jerzak KJ et al., 2020). Studi menunjukkan bahwa pasien dengan kanker payudara dan lesi payudara jinak memiliki kadar hepsidin yang meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (Ciniselli CM et al., 2015; Orlandi R et al., 2014). Hepsidin juga cenderung tinggi pada kanker payudara dengan metastasis tulang dan lesi hiperplasia payudara (Shao X et al., 2017), serta lebih meningkat pada kanker payudara dibandingkan lesi jinak payudara (Pizzamiglio et al., 2017).

Penelitian oleh Jerzak et al. (2020) menunjukkan adanya perbedaan asosiasi hepsidin terhadap luaran kanker payudara pada wanita obesitas dibandingkan non-obesitas. Peningkatan kadar hepsidin pada obesitas diduga berkaitan dengan aktivasi jalur JAK/STAT3 akibat inflamasi kronis terkait obesitas. Kondisi tersebut dapat menyebabkan gangguan homeostasis besi melalui penurunan absorpsi besi dan perubahan cadangan besi intraseluler. Mekanisme lain yang berperan adalah gangguan ferroptosis akibat perubahan metabolisme besi pada pasien obesitas, meskipun mekanisme pasti hubungan tersebut masih belum sepenuhnya diketahui.

Ferroportin merupakan protein transmembran (~571 asam amino) yang berada di membran basal enterosit, makrofag, dan hepatosit, berfungsi mengeksport besi ferrous (Fe^{2+}) dari sel ke dalam sirkulasi darah. Ferroportin sebagai satu-satunya jalur ekspor besi seluler, ia sangat krusial untuk menjaga homeostasis besi sistemik (De Domenico I et al., 2011; Ward DM, Kaplan J, 2012).

Ikatan hepsidin dengan ferroportin memicu ubiquitinasi, internalisasi dan degradasi protein ferroportin tersebut, sehingga ekspor zat besi terhambat. Hepsidin juga dapat langsung menutup ferroportin dan menghalangi keluarnya zat besi. Ferroportin diekspresikan tinggi pada enterosit duodenum, makrofag yang mendaur ulang zat besi dan hepatosit, oleh karena itu proses degradasi ferroportin yang dimediasi hepsidin akan mengganggu penyerapan zat besi dari makanan sekaligus membatasi pelepasan cadangan besi sehingga menurunkan kadar zat besi dalam sirkulasi (Xu Y et al., 2021; Jerzak KJ et al., 2020). Aksis hepsidin-ferroportin ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh kadar Hepsidin dan Ferroportin terhadap kadar plasma Fe (Aksis Hepsidin-Ferroportin) (Jerzak KJ et al., 2020)

Penelitian sebelumnya menegaskan peran penting ferroportin dalam kanker payudara. Beberapa studi melaporkan adanya penurunan signifikan kadar ferroportin pada sel dan jaringan kanker payudara yang disertai dengan peningkatan regulasi hepsidin (Pogribny IP, 2010). Temuan serupa dilaporkan oleh Pinnix et al., bahwa pasien kanker payudara dengan ekspresi ferroportin tinggi dan hepsidin rendah memiliki prognosis lebih baik, dengan 95% di antaranya tidak mengalami kekambuhan dalam 5 tahun. Ekspresi hepsidin yang tinggi dan ferroportin yang rendah pada jaringan tumor berhubungan dengan prognosis buruk (Pogribny IP, 2010).

Alat diagnostik dan metode pengobatan yang lebih efektif telah tersedia, namun hasil pengobatan kanker payudara masih belum memuaskan. Hal ini disebabkan oleh heterogenitas genetik dan morfologis tumor yang didasarkan pada tingkat keganasan sel tumor. Menurut beberapa penelitian, tingkat keganasan adalah faktor kunci yang mencerminkan fitur biologis tumor. Tingkat keganasan berkorelasi dengan perkembangan metastasis, sensitivitas terhadap kemoterapi dan memengaruhi pemilihan pengobatan, risiko kekambuhan dan kualitas hidup pasien (Shao X et al., 2017; Yalovenko et al., 2016; George A et al., 2021)

Saat ini diperlukan kriteria tambahan yang lebih informatif guna menilai tingkat keganasan serta memprediksi perjalanan klinis kanker payudara. Sepengetahuan peneliti, belum ada studi yang meneliti gambaran kadar hepsidin dan ferroportin pada berbagai *grading* kanker payudara. Peneliti berhipotesis bahwa semakin ganas sel tumor (semakin tinggi *grade* tumor), maka semakin tinggi kadar hepsidin dan semakin rendah kadar ferroportin. Gambaran kedua biomarker tersebut, diharapkan bisa menjadi salah satu nilai informatif tingkat keganasan sekaligus nilai prognostik pasien-pasien kanker payudara.

1.2. Rumusan Masalah

- a. Apakah terdapat perbedaan kadar hepsidin antar grade histopatologi kanker payudara (*Low Grade, Intermediate Grade, High Grade*) menurut sistem *Nottingham Histologic Score*?
- b. Apakah terdapat perbedaan kadar ferroportin antar grade histopatologi kanker payudara (*Low Grade, Intermediate Grade, High Grade*) menurut sistem *Nottingham Histologic Score*?
- c. Apakah terdapat peningkatan kadar hepsidin dengan peningkatan grade histopatologi kanker payudara menurut sistem *Nottingham Histologic Score*?
- d. Apakah terdapat penurunan kadar ferroportin dengan peningkatan grade histopatologi kanker payudara menurut sistem *Nottingham Histologic Score*?

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis kadar hepsidin dan ferroportin berdasarkan *grading* histopatologi kanker payudara

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengidentifikasi gambaran kadar hepsidin pada berbagai *grading* histopatologi kanker payudara.
- b. Mengidentifikasi gambaran kadar ferroportin pada berbagai *grading* histopatologi kanker payudara.
- c. Menganalisis perbedaan kadar hepsidin berdasarkan *grading* histopatologi kanker payudara.
- d. Menganalisis perbedaan kadar ferroportin berdasarkan *grading* histopatologi kanker payudara.

1.4. Hipotesis

- a. Terdapat perbedaan kadar hepsidin berdasarkan *grading* histopatologi kanker payudara. Semakin tinggi grade tumor, semakin tinggi kadar hepsidin.
- b. Terdapat perbedaan kadar ferroportin berdasarkan *grading* histopatologi kanker payudara. Semakin tinggi grade tumor, semakin rendah kadar ferroportin.

1.5. Manfaat Penelitian

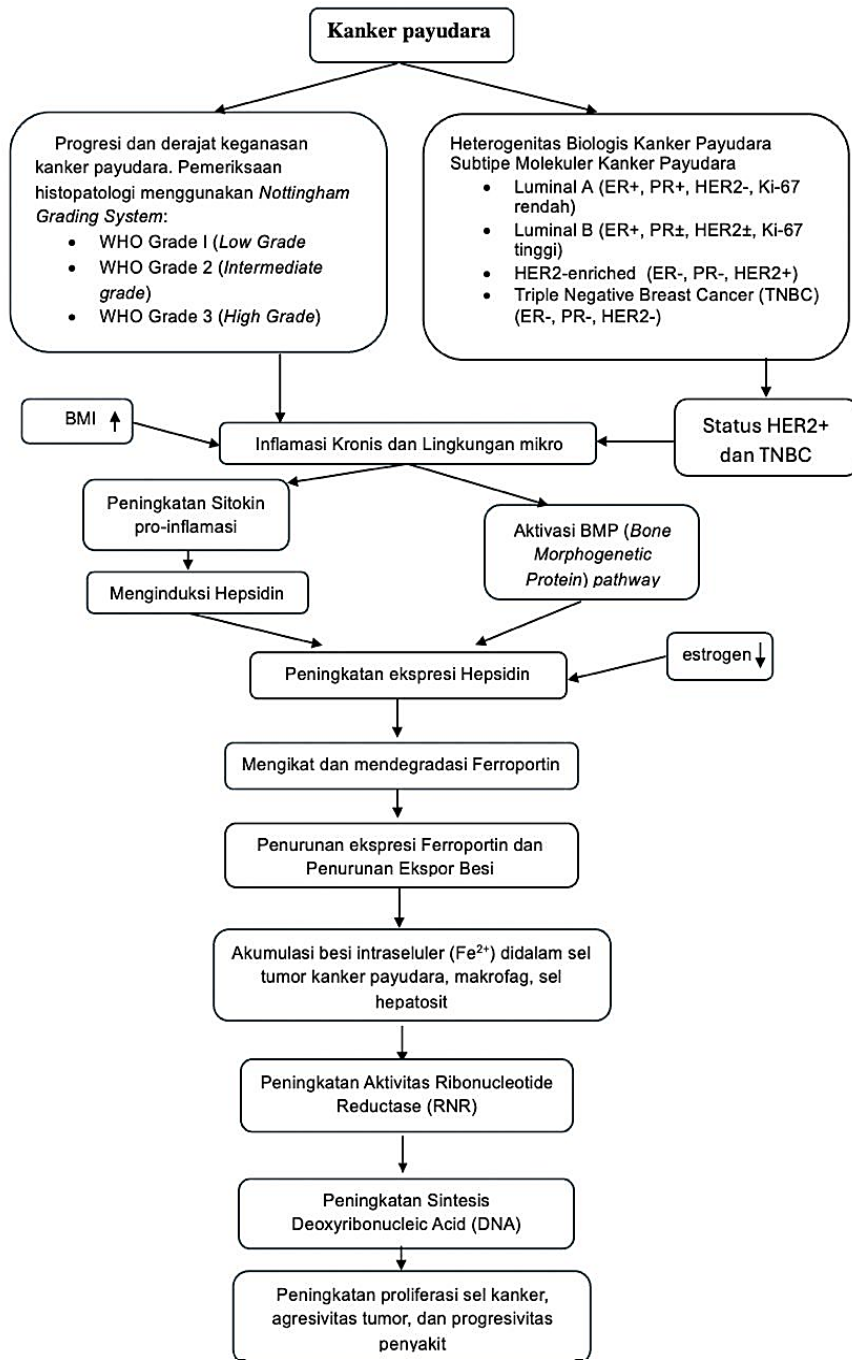
1.5.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang onkologi dan patologi anatomi, mengenai peran hepsidin dan ferroportin sebagai biomarker potensial dalam penentuan tingkat keganasan dan prognosis kanker payudara.

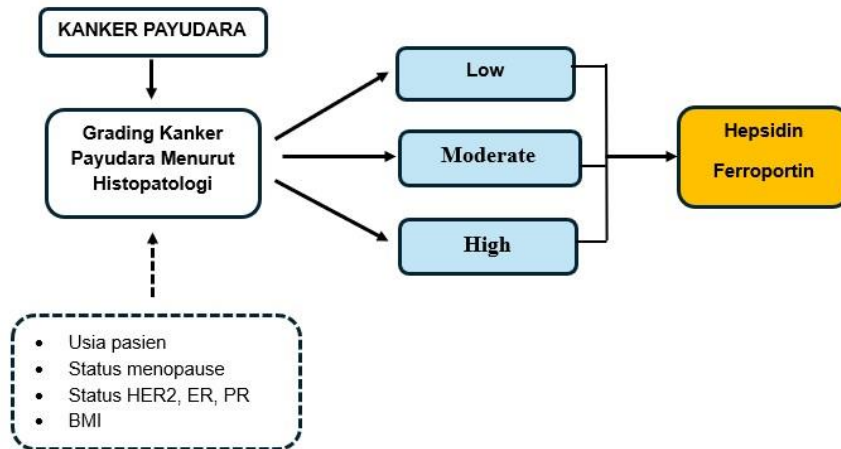
1.5.2 Manfaat Klinis

Memberikan informasi tambahan yang dapat membantu dalam penentuan tingkat keganasan dan prognosis pasien kanker payudara, serta dapat menjadi pertimbangan dalam strategi pengobatan yang lebih personal.

1.6. Kerangka Teori



1.7. Kerangka Konsep



Keterangan:



HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
 ER : Estrogen Receptor
 PR : Progesterone Receptor
 BMI : Body Mass Index

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain *cross sectional*

2.2. Tempat dan Waktu Penelitian

2.2.1 Tempat Penelitian

- a Instalasi Laboratorium Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dan Rumah Sakit Universitas Hasanuddin untuk pengambilan sampel dan data penelitian.
- b Laboratorium Penelitian Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar untuk pemeriksaan kadar Hepsidin dan Ferroportin.

2.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan November 2025 hingga April 2026.

2.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian merupakan pasien kanker payudara yang didiagnosis di Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dan Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar serta memenuhi kriteria inklusi penelitian.

2.4. Perkiraan Besaran Sampel

Penentuan besarnya sampel penelitian dihitung berdasarkan *sample size calculator* untuk *mean difference* yang diambil dari OpenEpi versi 3, menurut hasil penelitian sebelumnya oleh Pizzamiglio et al., membandingkan nilai Hepsidin pada pasien non kanker payudara, median= 0.60, standar deviasi= 1.2 dengan nilai hepsidin pada pasien kanker payudara, median=1.75, standar deviasi=2.2, maka didapatkan hasil sebagai berikut (Pizzamiglio et al., 2017):

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times 2 \times \sigma^2}{(d)^2}$$

Keterangan:

- n = ukuran sampel per kelompok
 $Z_{\alpha/2}$ = skor z untuk tingkat signifikansi (95% CI)
 Z_{β} = skor z untuk *power* (80% *power*)
 σ = standar deviasi
d = perbedaan rata-rata yang diharapkan

Start	Enter	Results	Examples	Help
Sample Size For Comparing Two Means				
Input Data				
Confidence Interval (2-sided)		95%		
Power		80%		
Ratio of sample size (Group 2/Group 1)		1		
	Group 1	Group 2	Difference*	
Mean	0.6	1.75	-1.15	
Standard deviation	1.2	2.2		
Variance	1.44	4.84		
Sample size of Group 1		38		
Sample size of Group 2		38		
Total sample size		76		
*Difference between the means				
Results from OpenEpi, Version 3, open source calculator--SSMean				
Print from the browser with ctrl-P				
or select text to copy and paste to other programs.				

Gambar 4. *Sample size calculator*

Berdasarkan rumus diatas, maka sampel minimal pada penelitian ini sebanyak 76 sampel penelitian dengan *confidence interval* 95% .

2.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

2.5.1 Kriteria inklusi:

- a. Pasien berumur lebih dari 18 tahun
- b. Pasien yang didiagnosis kanker payudara primer dan telah melakukan pemeriksaan histopatologi
- c. Pasien yang belum mendapatkan terapi antikanker (kemoterapi, radioterapi, terapi hormonal, atau terapi target) sebelum pengambilan sampel.
- d. Bersedia menjadi subjek penelitian dan menandatangani *informed consent*.

2.5.2 Kriteria eksklusi:

- a. Pasien kanker payudara yang disertai dengan riwayat penyakit kronis lainnya
- b. Pasien dengan riwayat transfusi darah dalam 3 bulan terakhir.
- c. Sampel jaringan yang tidak adekuat untuk pemeriksaan.

2.6. Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Setiap tindakan dilakukan seizin dan sepengetahuan subjek dan atau keluarga yang dijadikan sampel penelitian melalui lembar *informed consent*, dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin No. 959/UN4.6.4.5.31/PP36/2025.

2.7. Cara Kerja

2.7.1 Alokasi Subjek

Penelitian dilakukan pada pasien kanker payudara di Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo dan Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia mengikuti penelitian ini dengan menandatangani *informed consent*.

2.7.2 Cara Penelitian

- a. Dilakukan pencatatan identitas pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan memberikan penjelasan lengkap kepada pasien atau keluarganya mengenai apa yang akan dilakukan terhadap mereka dan bila setuju mereka akan mengisi dan menandatangani *informed consent*.
- b. Pengambilan sampel darah vena pada subjek penelitian yang masuk dalam kriteria inklusi.
- c. Pemeriksaan kadar Hepsidin dan Ferroportin dengan sampel serum di Laboratorium Penelitian Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar.

2.7.3 Prosedur Tes Laboratorium

2.7.3.1. Pemeriksaan Kadar Hepsidin

1) Pra Analitik

• Persiapan Pasien

Tidak ada persiapan khusus

• Persiapan Sampel

Serum: Darah utuh dibiarkan 2 jam pada suhu ruang atau semalaman 2–8°C, lalu disentrifugasi 20 menit pada 1,000×g. Supernatan digunakan langsung atau disimpan (-20°C hingga 12 bulan, -80°C hingga 2 tahun).

Alat dan bahan

Alat :

- 1) Inkubator 37°C
- 2) *Microplate reader* dengan filter 450 nm
- 3) Mikropipet presisi dan tips sekali pakai
- 4) Tabung sekali pakai untuk pengenceran sampel
- 5) Air destilasi/deionisasi
- 6) Kertas penyerap

Bahan :

- 1) Mikrotiter ELISA 48/96 *well* berlapis antibodi
- 2) *Lyophilized Standard*
- 3) *Sample Dilution Buffer*
- 4) *Concentrated Biotinylated antibody* (100×)
- 5) *Antibody Dilution Buffer*
- 6) *HRP-Streptavidin Conjugate* (SABC, 100×)
- 7) *Streptavidin-Biotin Complex* (SABC) *Dilution Buffer*
- 8) *TMB Substrate*
- 9) *Stop solution*
- 10) *Wash buffer* (25×)
- 11) *Purified Water*
- 12) *Plate sealer*

2) Analitik Prinsip Tes

Metode Sandwich ELISA (*Double Antibody*):

Pelat ELISA telah dilapisi dengan antibodi, kemudian sampel atau standar ditambahkan sehingga antigen hepsidin dapat berikatan dengan antibodi tersebut. Antibodi deteksi yang diberi label biotin ditambahkan untuk mengikat antigen, diikuti dengan penambahan HRP-streptavidin yang membentuk kompleks enzim. Substrat TMB ditambahkan dan

menghasilkan warna biru yang kemudian berubah menjadi kuning setelah diberikan *stop solution*. Intensitas warna yang terbentuk pada panjang gelombang 450 nm berbanding lurus dengan konsentrasi hepsidin dalam sampel.

Prosedur Kerja

1) Persiapan *standard dilution*

Larutkan standar dengan menambahkan 1 ml *sample dilution buffer* ke dalam tabung standar stok. Biarkan di suhu ruang selama 10 menit. Siapkan 6 tabung baru yang masing-masing ditambahkan 300 µl *sample dilution buffer*. Buat pengenceran dari tabung standar stok dengan pengenceran $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$

- 2) Tambahkan 100 µL standar kedalam *well standard*,
- 3) Tambahkan 100 µL sampel kedalam *well sample*
- 4) Tambahkan 100 µL *sample dilution buffer* kedalam *well blank*
- 5) Tutup *plate* dengan *plate sealer*, inkubasi 90 menit pada 37°C,
- 6) Buka *plate sealer* dan cuci *plate* sebanyak 2x dengan wash buffer 1x..
Cara membuat *wash buffer*: Campurkan 30 ml *concentrated wash buffer* dengan 720 ml *destilated water*.
- 7) Tambahkan 100 µL *biotinylated antibody*, inkubasi 60 menit pada 37°C, Cara membuat *biotinylated antibody*: campurkan 100 µl *Concentrated Biotinylated antibody* dengan 9.900 µl *antibody dilution buffer*.
- 8) Buka *plate sealer* dan cuci *plate* sebanyak 3x dengan wash buffer 1x.
- 9) Tambahkan 100 µL HRP-Streptavidin (SABC), inkubasi 30 menit pada 37°C. Cara membuat HRP-Streptavidin: campurkan 100 µl *HRP-Streptavidin Conjugate* dengan 9.900 µl *HRP-Streptavidin Conjugate dilution buffer*
- 10) Buka *plate sealer* dan cuci *plate* sebanyak 5x dengan wash buffer 1x.
- 11) Tambahkan 90 µL substrat TMB, inkubasi 10-20 menit pada 37°C di ruang gelap.
- 12) Tambahkan 50 µL *stop solution*.
- 13) Baca OD pada 450 nm segera.
- 14) Hitung konsentrasi sampel dengan kurva standar.

3) Pasca Analitik

Batas Linieritas : 31.25 – 2000 pg/mL

2.7.3.2. Pemeriksaan Kadar Ferroportin

1) Pra Analitik

• Persiapan Pasien

Tidak ada persiapan khusus

• Persiapan Sampel

Serum: Biarkan darah 2 jam pada suhu ruang atau semalaman di 4°C, lalu sentrifugasi 15 menit (1000×g, 2–8°C). Ambil supernatan.

Alat dan bahan

Alat :

- 1) Pembaca mikroplate (450 nm)
- 2) Mikropipet presisi, tip sekali pakai, tabung EP
- 3) Inkubator 37°C
- 4) Air deionisasi atau destilasi
- 5) Kertas penyerap

Bahan :

- 1) *Micro ELISA plate* (pre-coated anti-Ferroportin)
- 2) *Reference Standard* dan *Sample Diluent*
- 3) Concentrated Biotinylated Detection Antibody (100×)
- 4) *Concentrated HRP Conjugate* (100×)
- 5) Concentrated Wash Buffer(25×)
- 6) Reagen substrat (TMB)
- 7) *Stop solution*
- 8) *Plate seler*

2) Analitik Prinsip Tes

Kit ini berbasis Sandwich ELISA. Pelat terlebih dahulu dilapisi dengan antibodi anti-Ferroportin, kemudian sampel atau standar ditambahkan sehingga dapat berikatan dengan antibodi tersebut, dilanjutkan dengan penambahan antibodi deteksi yang telah dibiotinilasi serta HRP-avidin. Substrat TMB ditambahkan hingga menghasilkan warna biru yang kemudian berubah menjadi kuning setelah penambahan larutan penghenti. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm, nilai OD yang diperoleh berbanding lurus dengan konsentrasi Ferroportin dalam sampel.

Prosedur Kerja

1) Persiapan *standard dilution*

Larutkan standar dengan menambahkan 1 ml *sample dilution buffer* ke dalam tabung standar stok. Biarkan di suhu ruang selama 10 menit. Siapkan 6 tabung baru yang masing-masing ditambahkan 300 µl *sample dilution buffer*. Buat pengenceran dari tabung standar stok dengan pengenceran $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$

2) Tambahkan 100 µL standar kedalam *well standard*,

3) Tambahkan 100 µL sampel kedalam *well sample*

4) Tambahkan 100 µL *sample dilution buffer* kedalam *well blank*

5) Tutup *plate* dengan *plate sealer*, inkubasi 90 menit pada 37°C,

6) Buka *plate sealer* dan cuci *plate* sebanyak 2x dengan wash buffer 1x.. Cara membuat *wash buffer*: Campurkan 30 ml *concentrated wash buffer* dengan 720 ml *destilated water*.

7) Tambahkan 100 µL *biotinylated antibody*, inkubasi 60 menit pada 37°C, Cara membuat *biotinylated antibody*: campurkan 100 µl *Concentrated Biotinylated antibody* dengan 9.900 µl *antibody dilution buffer*.

8) Buka *plate sealer* dan cuci *plate* sebanyak 3x dengan wash buffer 1x.

9) Tambahkan 100 µL HRP-Streptavidin (SABC), inkubasi 30 menit pada 37°C. Cara membuat HRP-Streptavidin: campurkan 100 µl *HRP-Streptavidin Conjugate* dengan 9.900 µl *HRP-Streptavidin Conjugate dilution buffer*

10) Buka *plate sealer* dan cuci *plate* sebanyak 5x dengan wash buffer 1x.

11) Tambahkan 90 µL substrat TMB, inkubasi 15 menit 37°C di ruang gelap

12) Tambahkan 50 µL *stop solution*.

13) Baca OD pada 450 nm segera.

14) Hitung konsentrasi sampel dengan kurva standar.

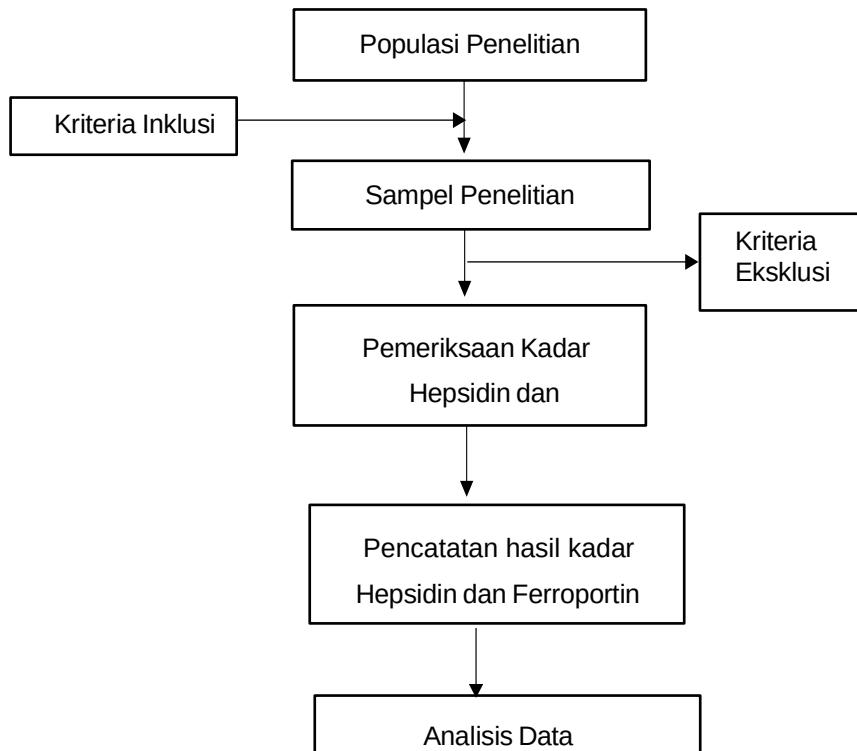
3) Pasca Analitik

Batas Linieritas :

Tabel 3. Batas Linearitas Ferroportin

		Serum
1:2	Range (%)	88-100
	Average (%)	94
1:4	Range (%)	88-100
	Average (%)	95
1:8	Range (%)	93-106
	Average (%)	98
1:16	Range (%)	86-101
	Average (%)	93

2.8. Skema Alur Penelitian



2.9. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

- a. Hepsidin adalah kadar hormon hepsidin yang terukur di dalam darah dan mencerminkan aktivitas pengaturan zat besi oleh tubuh, diukur dalam nanogram per mililiter (ng/mL). Pengukuran diperoleh dari sampel serum darah vena yang dianalisis menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Nilai Normal: 31.25-2000 pg/mL
- b. Ferroportin adalah kadar ferroportin yang terukur di dalam darah dan mencerminkan aktifitas protein transmembran yang mengekspor besi ferrous (Fe^{2+}) dari sel ke dalam sirkulasi darah, diukur dalam nanogram per mililiter (ng/mL). Pengukuran diperoleh dari sampel serum darah vena yang dianalisis menggunakan metode ELISA. Nilai normal: 0.31- 20 ng/mL
- c. Grade kanker payudara adalah sistem penilaian derajat keganasan tumor berdasarkan gambaran histopatologi menggunakan sistem *Nottingham Histologic Score (Scarff-Bloom-Richardson modification)* yang menilai pembentukan tubulus, pleomorfisme inti, dan jumlah mitosis. Berdasarkan skor total, kanker payudara diklasifikasikan menjadi:
 1. *Low Grade (Grade I/ well differentiated)*
 Ditandai dengan pembentukan tubulus yang baik, pleomorfisme inti ringan, dan aktivitas mitosis rendah. Sel tumor masih menyerupai jaringan payudara normal sehingga menunjukkan derajat keganasan rendah.
 2. *Intermediate Grade (Grade II/ moderately differentiated)*
 Ditandai dengan pembentukan tubulus sedang, pleomorfisme inti sedang, dan aktivitas mitosis sedang. Gambaran histopatologi menunjukkan diferensiasi sel tumor sedang dengan derajat keganasan menengah.
 3. *High Grade (Grade III/ poorly differentiated)*
 Ditandai dengan pembentukan tubulus minimal atau tidak terbentuk, pleomorfisme inti berat, dan aktivitas mitosis tinggi. Sel tumor tampak sangat atipik, kurang berdiferensiasi, serta menunjukkan derajat keganasan tinggi.

Analisis data dilakukan menggunakan SPSS versi 25. Analisis statistik meliputi perhitungan statistik deskriptif dan distribusi frekuensi untuk menggambarkan karakteristik data. Uji normalitas dilakukan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* untuk menentukan distribusi data. Uji komparatif menggunakan *Kruskal-Wallis test* untuk data yang tidak berdistribusi normal dan *ANOVA test* untuk data yang berdistribusi normal, *Least Significant Difference (LSD) test* sebagai metode *multiple comparisons* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok secara spesifik. Hasil uji statistik dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$.