

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian retrospektif deskriptif untuk melihat pola ekspresi dari Ki- 67 pada pasien KPDluminal A dan luminal B.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di divisi Bedah Onkologi FK USU RSUP H. Adam Malik dan bagian Patologi Anatomi RSUP H. Adam Malik Medan. Penelitian ini dilaksanakan setelah proposal disetujui komite etik.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi

Populasi penelitian ini adalah semua pasien KPD yang datang di divisi Bedah Onkologi RSUP. H. Adam Malik yang sudah dilakukan pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia.

Sampel

Pasien KPD di RSUP H. Adam Malik Medan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria Inklusi:

- Semua kasus KPD yang diagnosis nya ditegakkan secara histopatologi sebagai karsinoma duktal invasive dan sudah dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

Kriteria Eksklusi:

- Semua data yang tidak lengkap
- Pemeriksaan patologi anatomi yang tidak lengkap.

3.4 Besar Sampel

Penderita KPD yang datang ke RSUP H. Adam Malik yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang dapat dijangkau oleh peneliti. Dan besar sampel diperoleh dengan menggunakan rumus (Dahlan, 2013) :

$$n = \frac{(Z\alpha)^2 PQ}{d^2} = \frac{(1,96)^2 \times 0,2169 \times 0,7831}{(0,1)^2} = 63$$

$Z\alpha$: tingkat kepercayaan (1,96 CI 95%)

P : proporsi pasien KPD dari tinjauan pustaka (0,2169)

Q : 1 - P

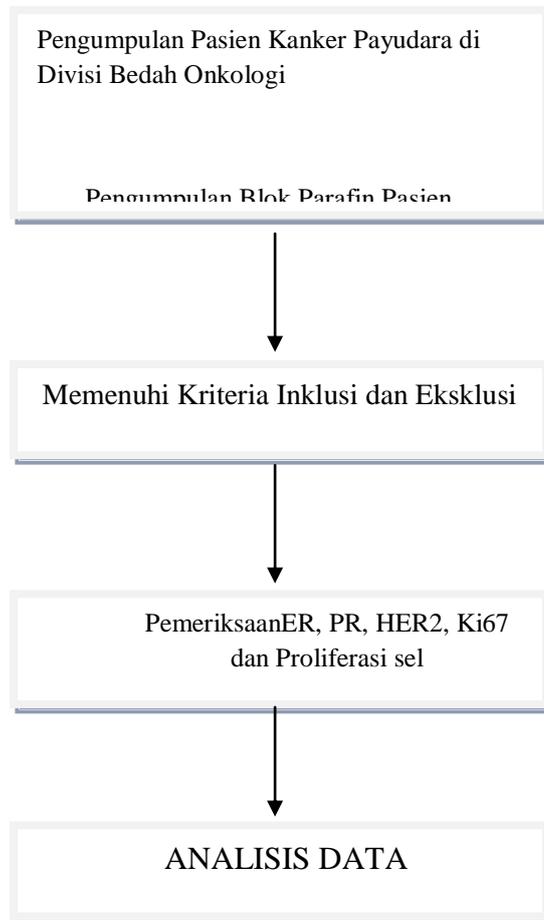
d : tingkat ketetapan absolute (10%)

Maka di dapatkan sampel sebesar : 63

3.5 Cara Penelitian

1. Pengumpulan data pasien dan sediaan preparat (block parafin) pasien KPD yang telah dilakukan pemeriksaan imunohistokimia di laboratorium Patologi Anatomi RSUP H. Adam Malik Medan.
2. Melakukan pencatatan dan pengolahan data.

ALUR PENELITIAN



3.6 Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan data rekam medik dan parafin blok penderita KPD sebagai subjek penelitian, yang selama pelaksanaannya tidak bertentangan dengan nilai-nilai kemanusiaan dan kode etik penelitian biomedik. Izin didapat dari Komisi Etika Penelitian Fakultas Kedokteran USU.

3.7 Definisi Operasional

- Usia adalah usia pada saat penderita datang ke RSUP H. Adam Malik dan ditegakkan diagnosis menderita KPD.
- Luminal A adalah subtype KPD dengan ER (+), PR (+), HER2 (-) dan Ki67 < 20%.

- Luminal B adalah subtype KPD dengan ER (+), PR (+), HER2 (+) dan/atau (-) dan Ki67 $\geq 20\%$.
- Ekspresi Her2 adalah dengan melihat data pasien penderita kanker payudara yang ada di divisi bedah onkologi Departemen Ilmu Bedah RSUP H. Adam Malik Medan yang telah dilakukan pemeriksaan HER2.

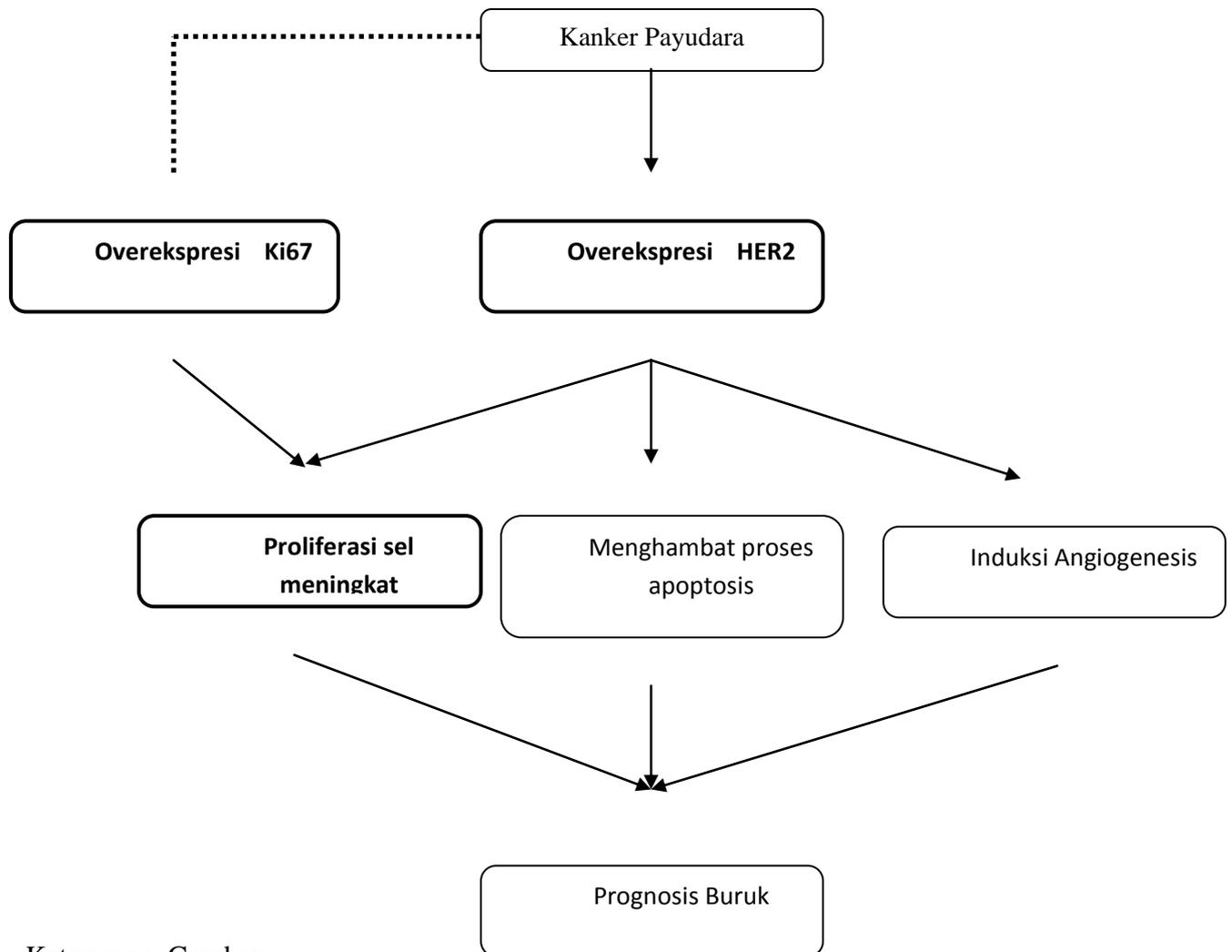
Perhitungan intensitas hasil pulasan imunositokimia HER2/neu adalah sebagai berikut (Keith M, 2007) :

- Skor 0 : negatif, tidak dijumpai sitoplasma sel yang terpulask atau sangat tipis dan $\leq 10\%$ dari sel-sel tumor.
- Skor +1 : $\leq 10\%$ sel yang terpulask fokal atau hanya setempat dari membran sitoplasma.
- Skor +2 : tampilan lemah atau moderate komplisk pada membran sitoplasma pada $\geq 10\%$ sel-sel tumor.
- Skor +3 : tampilan kuat dan komplisk pada membran sitoplasma $\geq 10\%$ sel sel tumor

HER2 - apabila didapat skor 0, +1, dan +2, HER2 positif apabila didapat skor +3

- Ekspresi protein Ki-67 adalah penilaian protein Ki-67 yang terpulask berwarna coklat dari hasil pemeriksaan patologi dengan pengecatan *Immuno Histo Chemistry Staining* (IHC) dari blok parafin spesimen biopsi tumor primer. Dilakukan perhitungan kuantitatif dari protein Ki-67 yang tercat oleh IHC dan terlihat pada inti sel dalam satu lapangan pandang mikroskopis. Interpretasi pengecatan IHC dinyatakan sebagai persentase inti sel yang terpulask dengan berbagai intensitas. Interpretasi dilakukan dengan menghitung sel yang terpulask pada inti sel dari 100 sel kanker pada pembesaran 400 x.²⁵Oleh karena tujuan penelitian ini mengetahui pola ekspresi Ki-67 maka pada penelitian ini Nilai batasan (*cut of point*) Ki67 yang digunakan berdasarkan PERABOI yaitu 20% yang menunjukkan *low* dan *over* ekspresi.

3.8 Kerangka Teori



Keterangan Gambar:

————— : Hubungan dalam Kerangka Teori

..... : Keterkaitan Variabel yang diteliti

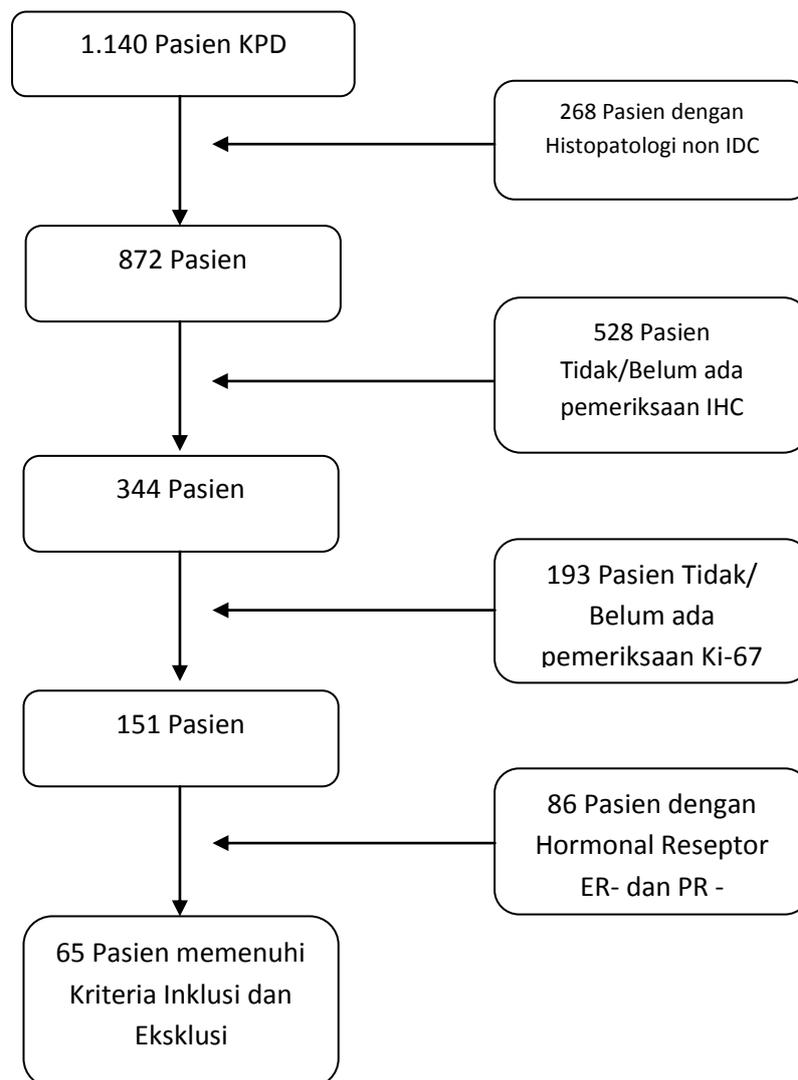
3.9 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Data dikumpulkan dari divisi Bedah Onkologi dan bagian Patologi Anatomi RSUP. H. Adam Malik, kemudian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel distribusi dan diagram. Penjelasan tabel dan diagram dalam bentuk narasi.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Setelah dilakukan evaluasi populasi sampel penderita kanker payudara dari periode waktu 2013-2015, diperoleh 65 sampel dari 1140 pasien KPD yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusI.



4. 1 Analisa Hasil

Berdasarkan data sampel yang telah diambil, hasil penelitian data demografik dan karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada tabel-tabel yang disajikan berikut ini.

Tabel 4.1 Karakteristik klinik dari 65 pasien

Variabel	Jumlah	%
Jenis Kelamin:		
Laki-laki	0	-
Perempuan	65	100
Usia :		
< 35 tahun	2	3,1
35-50 tahun	38	58,4
> 65 tahun	23	35,4
Pekerjaan :	2	3,1
PNS		
Pegawai Swasta	10	15,4
IRT	2	3,1
Petani		
Histopatologi :	48	73,8
IDC (<i>Invasive Ductal carcinoma</i>)	5	7,7
ILC (<i>Invasive Lobular Carcinoma</i>)		
Grading :		
Grade I	65	100
Grade II	0	-
Grade III		

	15	23,1
	43	66,2
	7	10,7

Mayoritas responden penelitian ber-usia 35-50 tahun (58,4%) diikuti responden ber-usia 51-65 tahun (35,4%).

Tabel 4.2 Gambaran Imunohistokimia Pasien Kanker Payudara Luminal A dan B.

IHK	Jumlah	%
Imunohistokimia :		
<i>Estrogen Receptor (ER)</i>		
• ER (+)	54	83,1
• ER (-)	11	16,9
<i>Progesteron Receptor (PR)</i>		
• PR (+)	44	67,7
• PR (-)	21	32,3
HER2		
• Tidak ekspresi	49	75,4
• Ekspresi	16	24,6
Ki-67		
• <i>Low</i> ekspresi	49	75,4
• <i>Over</i> ekspresi	16	24,6

Gambaran imunohistokimia pasien kanker payudara tipe luminal A dan B di RSUP HAM menunjukkan yang memiliki ekspresi HER2 sebanyak 16 (24,6%) dan ekspresi tinggi Ki-67 sebanyak 16 (24,6%).

Tabel 4.3 Hasil Pemeriksaan ER, PR dan HER2 Pasien Kanker Payudara Tipe Luminal A dan B di RSUP HAM

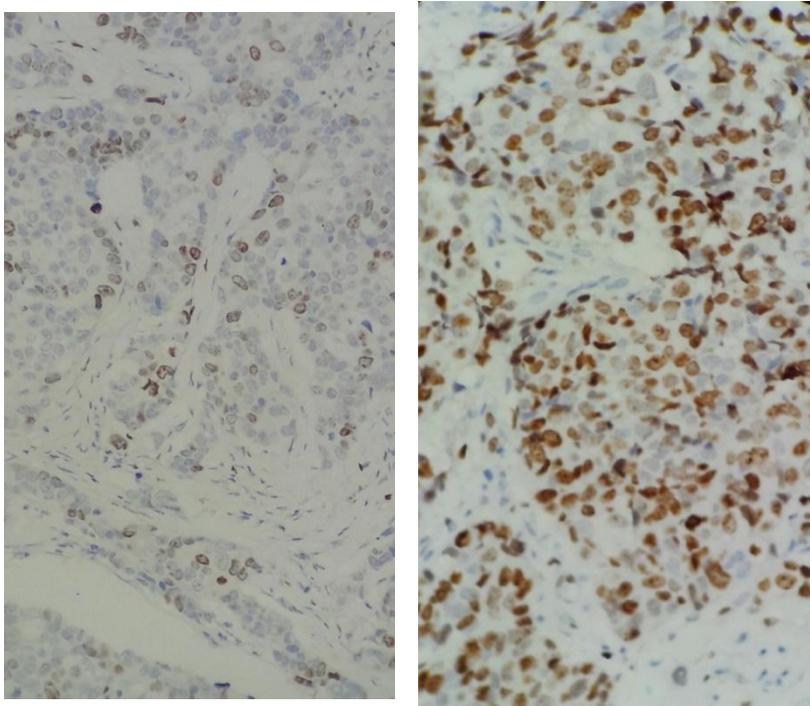
No.	Pemeriksaan	Frekuensi	%
1.	Reseptor Hormon		
	ER + dan PR +	33	50,8
	ER + dan PR -	21	32,3
	ER – dan PR +	11	16,9
Total		65	100
2.	HER2		
	Positif	16	24,6
	Negatif	49	75,4
	Total	65	100

Dari pemeriksaan reseptor hormonal pada pasien kanker payudara tipe luminal A dan B menunjukkan reseptor hormonal ER dan PR positif merupakan yang terbanyak dengan 33 pasien (50,8%). Kasus ER dan PR negatif menunjukkan frekuensi tertinggi kedua dengan 21 pasien (32,3%). Sementara untuk pemeriksaan terhadap HER2 , didapatkan insiden HER2 positif 16 pasien (24,6%).

Seluruh sampel dilakukan pemeriksaan Ki67 dengan imunohistokimia, dengan menggunakan alat Bond Max Full automatic, Leica dengan menggunakan reagen Mouse Monoclonal Antibody Ki67 antigen, product code : NCL – Ki67 – MM1.

4.2 Gambaran Histologi Ki67

Setelah dilakukan pewarnaan, didapatkan gambaran histology seperti pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 :Imunohistokimia Ki-67 A. *Low* Proliferasi, B. *High* Proliferasi (Sumber : Laboratorium Patologi Anatomi RSUP H. Adam Malik, 2015)

Tabel 4.4 **Distribusi Frekuensi Ekspresi Ki-67 Responden (*cut of point* 20%)**

Ki67	Frekuensi	%
Low	49	75,4
Over	16	24,6
Total	65	100

Pada pasien KPD tipe luminal A dan B pada penelitian ini didapati ekspresi tinggi Ki-67 yaitu sebanyak 16 pasien (24,6%), sedangkan sebanyak 49 pasien (75,4%) dengan ekspresi rendah Ki-67.

Tabel 4.5 Distribusi ER/PR terhadap Her2 dan Ki 67 (cut of point 20%)

IHK	Her2+	Her2-	Ki-67 High Ekspresi	Ki-67 Low Ekspresi
ER+/PR+	6/65	27/65	8/65	25/65
ER +/PR-	5/65	16/65	5/65	16/65
ER -/PR +	5/65	6/65	3/65	8/65

Dari tabel diatas jumlah kasus dengan ER+/PR+ dan Her2 + sebanyak 6 dari 65 kasus, ER+/PR- dan Her2 + sebanyak 5 dari 65 kasus, ER-/PR+ dan Her2 + sebanyak 5 dari 65 kasus.

Terhadap ekspresi tinggi Ki 67 dijumpai 8 dari 65 kasus dengan ER+/PR+, sebanyak 5 dari 65 kasus dengan ER+/PR-, dan 3 kasus dengan ER-/PR+.

Tabel 4.6 Distribusi Her2 terhadap Ki-67 (cut of point 20%)

IHK	Ki-67 High Ekspresi	Ki-67 Low Ekspresi
Her2 +	4/65	12/65
Her2 -	12/65	37/65

Dari tabel diatas dijumpai pasien dengan Her2 + dan ekspresi tinggi Ki-67 hanya 4 dari 65 kasus. Sedangkan pasien dengan Her2 negatif dan ekspresi rendah Ki-67 sebanyak 37 dari 65 kasus.

Tabel 4.7 Jenis Subtipe Luminal Kanker Payudara di RSUP HAM

Subtipe	Frekuensi	%
Luminal A	37	56,9
Luminal B (HER2 -)	12	18,5
Luminal B (HER2 +)	16	24,6
Total	65	100

Jenis subtipe kanker payudara yang paling banyak dari penelitian ini adalah Luminal A sebanyak 37 pasien (56,9%) diikuti dengan luminal B (HER2 +) sebanyak 16 pasien (24,6%).

BAB 5

PEMBAHASAN

Pemeriksaan imunohistokimia pada pasien kanker payudara di RSUP H.Adam Malik Medan mulai dilakukan sejak April 2014. Jika dilihat perbandingan antara pemeriksaan imunohistokimia dengan jumlah pasien kanker payudara, proporsi pemeriksaan masih sangat kecil.

Berdasarkan pemeriksaan reseptor hormonal secara keseluruhan pada pasien KPD tipe luminal A dan B, reseptor hormonal positif ganda merupakan yang terbanyak dengan 33 pasien (50,8%). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan di Jerman oleh Inwald *et al* dengan sampel 3658, dimana reseptor hormone positif ganda ditemukan terbanyak mencapai 76,3%.

Penelitian di Mosul, Irak oleh Jerjees DA *et al* sebanyak 1483 kasus KPD tipe luminal hasilnya didominasi oleh HER2 negatif sebesar 88% dan Her-2 positif sebanyak 12%. Begitu juga penelitian oleh Inwald *et al* di Jerman menunjukkan karakteristik Her2 negatif sebesar 81,8%. Pada penelitian ini juga didapati dari pemeriksaan Her2 negatif sebanyak 49 kasus (75,4%).

Ki67 adalah marker yang memberikan gambaran proliferasi sel, yang memberikan gambaran prognosis penderita kanker, dalam penelitian ini dilakukan pada penderita KPD untuk membedakan antara luminal A dan B. Pada penelitian ini ditemui ekspresi tinggi Ki-67 yaitu sebanyak 16 pasien (24,6%), sedangkan sebanyak 49 pasien (75,4%) dengan ekspresi rendah Ki-67. Berbeda dengan penelitian oleh Jerjees DA *et al*, sebanyak 55,4% memiliki ekspresi tinggi Ki-67. Menurut penelitian Taneja P *et al* tahun 2010, overekspresi Ki67 lebih dari 20 – 50% merupakan resiko tinggi terjadinya penyakit berulang, menunjukkan hubungan yang signifikan secara statistik dengan klinis, seperti *desease-free survival* dan *overall survival*. Sesuai dengan penelitian Jeong S *et al* tahun 2011, tingginya ekspresi Ki67 berhubungan dengan prognosis buruk pada penderita kanker payudara dengan memendeknya *disease-free survival* dan *overall survival*.

Beberapa peneliti menyatakan bahwa tidak dijumpai hubungan antara overaktifitas Ki67 dengan penanda prognosis lainnya. Tetapi pada kenyataannya, banyak penelitian tidak dapat menyingkirkan hubungan yang positif antara Ki67 dengan grading histologi dan status kelenjar getah bening. Demikian juga hubungan Ki67 dengan status hormone steroid dimana

dijumpai hubungan terbalik antara status ER dan PR dengan Ki67. Pada penelitian ini dijumpai 41 dari 65 kasus (63,1%) ER positif memiliki ekspresi rendah Ki-67. Hal ini sesuai dengan Inwald *et al* yang menyatakan ER positif memiliki hubungan dengan rendahnya ekspresi Ki-67. Berbeda dengan penelitian oleh Yan *et al* di China, diperoleh 80 dari 156 kasus ER positif memiliki ekspresi tinggi Ki-67.

Tetapi hubungan ekspresi *epidermal growth factor* dan *human epidermal growth factor reseptor 2 (Her2)* dengan Ki67 masih diperdebatkan. Ekspresi Ki67 dan Her2 sama-sama digunakan sebagai faktor prognosis dan prediktif. Keduanya dinyatakan memiliki peranan secara independen pada peningkatan proliferasi sel.(Kontzoglou *et al.*, 2013; Shokouh *et al.*, 2015) Pada pasien KPD dengan overekspresi Her2 tanpa memperhatikan ekspresi Ki67 menunjukkan prognosis yang buruk termasuk derajat tumor, ukuran tumor dan keterlibatan nodul. Demikian juga pasien KPD dengan overekspresi Ki67 dengan nilai Her2 negatif tetap memperlihatkan agresifitas yang tinggi dari kanker tersebut.(Jerjees *et al.*, 2014)

Pada penelitian ini dijumpai pasien dengan Her-2 positif dan ekspresi tinggi Ki-67 hanya 4 dari 65 kasus. Sedangkan pasien dengan Her-2 negatif dan ekspresi rendah Ki-67 sebanyak 37 dari 65 kasus. Santer *et al* dalam penelitiannya tahun 2014 dengan 58 sampel memperoleh 10 pasien KPD dengan Her-3 positif dan ekspresi tinggi Ki-67. Shokouh TZ *et al* dalam penelitiannya mencari hubungan antara Ki67 dengan beberapa penanda tumor didapatkan hubungan yang signifikan antara Her2 dan Ki67.

Penentuan subtipe kanker payudara sangat penting untuk mengetahui prognosis dan hasil pengobatan. Dalam penentuan subtipenya dilakukan pemeriksaan imunohistokimi biomarker seperti ER, PR, HER2, dan Ki67. Dengan pemeriksaan biomarker tersebut dapat kita pisahkan subtipe penderita kanker payudara yaitu luminal A dan luminal B. Dengan menetapkan *cut of point* Ki67, dikategorikan penderita kanker payudara dengan low ekspresi Ki67 dan over ekspresi Ki67. Hanya sekitar 24,6% penderita kanker subtipe luminal B dengan HER2 positif, ini menunjukkan bahwa dengan hanya mengetahui HER2 tidak cukup sensitif untuk mengidentifikasi subtipe luminal B. Kanker payudara luminal B adalah subtype klinis penting terkait dengan hasil pengobatan yang buruk pada penderita yang diberikan atau tidak diberikan terapi sistemik adjuvant.(Kontzoglou *et al.*, 2013)

Dari hasil yang didapat peneliti menemukan kelemahan pada penelitian ini yaitu distribusi sampel yang tidak merata sehingga menunjukkan hasil yang kurang sesuai dari penelitian – penelitian sebelumnya. Dan mungkin juga disebabkan kekurangan dalam

prosedur pemeriksaan imunohistokimia, seperti kita ketahui pemeriksaan Ki67 dilaksanakan di RSUP H. Adam Malik dalam kurun waktu belakangan ini.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

- 6.1.1 Reseptor hormonal positif ganda (ER+/PR+) merupakan yang terbanyak dengan 33 pasien (50,8%) diikuti dengan reseptor hormonal ER+/PR - 21 kasus (32,3%).
- 6.1.2 Pada Pasien KPD luminal A dijumpai Ki-67 dengan ekspresi rendah sebanyak 37 kasus (56,9%), pasien KPD luminal B dijumpai Ki-67 ekspresi tinggi sebanyak 16 kasus (24,6%) dan Ki-67 ekspresi rendah sebanyak 12 kasus (18,5%).
- 6.1.3 Her2 positif dan ekspresi tinggi Ki-67 hanya 4 kasus, sedangkan pasien dengan Her2 negatif dan ekspresi rendah Ki-67 sebanyak 37 kasus.

6.2 Saran

- 6.2.1 Perlunya dilakukan penelitian untuk melihat hubungan ekspresi Her2 dan Ki67 pada penderita KPD tipe luminal A dan B di RSUP H. Adam Malik.