

Ekspresi CD44 dan ALDH1 (Penanda Sel Punca Kanker) sebagai Prediktor Respons Kemoterapi Neoadjuvant Cisplatin pada Kanker Serviks Uteri Stadium IIB

GUNAWAN RUSULDI DAN BRAHMANA ASKANDAR

Program Pendidikan Konsultan Divisi Onkologi Ginekologi Departemen/SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

Diterima: 18 Agustus 2017; Direview: 24 Agustus 2017; Disetujui: 5 September 2017

ABSTRACT

Giving neoadjuvant chemotherapy allows stage IIB cervical cancer having surgery with a chance of avoiding radiotherapy. Giving neoadjuvant chemotherapy in several studies produces varied responses. The method for predicting whether a cervical cancer patient experiences response of treatment in neoadjuvant chemotherapy becomes important thing, considering the side effects of chemotherapy, time, and cost. Sub-population of cells called Cancer Stem Cells (CSC) is something which is alleged to be responsible for cancer growth, recurrence and the process of resistance to chemotherapy and radiation. Some researchers proved that this occurrence is due to the cancer stem cell which is surviving after chemotherapy. The presence of cervical cancer stem cells is shown by CD44 and ALDH1. This research proves there is connection between the expression of CD44 and ALDH1 as a marker of cancer stem cells with cisplatin neoadjuvant chemotherapy response and correlation in the increasing of expression of CD44 and ALDH1 (a marker of cancer stem cells) against cisplatin neoadjuvant chemotherapy resistance in cervical cancer stage IIB. Design observational analytic form prospectively study with total samples 30 patient cervical cancer IIB from December 2016 until May 2017. Clinical and MRI examination and cervical biopsy to immunohistochemistry examination for CD44 and ALDH1. Administration of neoadjuvant chemotherapy (NAC) cisplatin 50 mg/m² 4 times everyweek. After 2–3 weeks after last NAC, repeat to MRI examination. Assessment response therapy with RECIST criteria. Chemotherapy response obtained Partial Response (PR) 12 pts (40%), Stable Disease (SD) 12 pts (40%), and Progressive Disease (PD) 6 pts (20%). There is Relationship Strong Negative Correlation Expression CD44 with chemotherapy response (Spearman test $r_s = -0.903$ and $p = 0.000$); analysis ROC curve obtained cut off 37.00 and 76.00 with accuracy 86,67%. Also there is Relationship Strong Negative Correlation Expression ALDH1 with chemotherapy response (Spearman test $r_s = -0.893$ and $p = 0.000$); analysis ROC curve obtained cut off 55.00 and 94.00 with accuracy 93,33%. Analysis with Spearman there is Strong Correlation between CD44 with ALDH1 ($r_s = 0.907$ and $p = 0.000$). And ALDH1 is more better predictor than CD44 to predict chemotherapy response (beta coefficient CD44 = -0.389 , ALDH1 = -0.551). CD44 and ALDH1 expression can be used a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy cisplatin in patient with cervical cancer IIB; and ALDH1 more better as predictor than CD44.

Keyword: neoadjuvant chemotherapy, cisplatin, RECIST, CD44, ALDH1

KORESPONDENSI:

Gunawan Rusuldi
Program Pendidikan
Konsultan Divisi Onkologi
Ginekologi Dep./
SMF Obstetri Ginekologi
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga/
RSUD Dr. Soetomo
Surabaya.
Email: grusuldi@gmail.com

ABSTRAK

Pemberian kemoterapi neoadjuvant memungkinkan kanker serviks stadium IIB dapat dilakukan pembedahan dengan kemungkinan menghindari pemberian radioterapi. Pemberian kemoterapi neoadjuvant pada beberapa penelitian memberikan hasil yang bervariasi. Metode untuk memprediksi apakah seseorang penderita kanker serviks mengalami respons terapi pada kemoterapi neoadjuvant menjadi hal yang penting, mengingat efek samping kemoterapi, waktu, dan biaya. Subpopulasi sel yang dinamakan sel punca kanker/*cancer stem cells* (CSC) tersebutlah yang diduga bertanggung jawab terhadap terjadinya pertumbuhan kanker, kekambuhan, serta proses resistansi terhadap kemoterapi dan radiasi. Beberapa peneliti membuktikan bahwa kejadian seperti ini disebabkan sel punca kanker yang tetap

bertahan hidup pasca-kemoterapi. Keberadaan sel punca kanker serviks ditunjukkan oleh CD44 dan ALDH1. Penelitian ini membuktikan adanya hubungan antara ekspresi CD44 dan ALDH1 sebagai penanda sel punca kanker dengan respons kemoterapi neoadjuvan cisplatin; dan terdapat korelasi peningkatan ekspresi CD44 dan ALDH1 (penanda sel punca kanker) terhadap resistansi kemoterapi neoadjuvan cisplatin pada kanker serviks stadium IIB. Penelitian ini menggunakan rancangan analitik observasional secara prospektif dengan jumlah sampel 30 pasien kanker serviks IIB mulai Desember 2016 sampai Mei 2017. Pemeriksaan klinis dan MRI serta biopsi serviks dilakukan, kemudian dilanjutkan pemeriksaan imunohistokimia CD44 dan ALDH1. Pemberian kemoterapi neoadjuvan (NAC) cisplatin 50 mg/m² dilakukan 4 kali setiap minggu. Setelah 2–3 minggu NAC terakhir pasien dilakukan pemeriksaan ulang klinis ataupun MRI untuk menilai respons terapi secara kriteria RECIST. Respons kemoterapi menunjukkan *partial response* (PR) 12 subjek (40%), *stable disease* (SD) 12 subjek (40%), and *progressive disease* (PD) 6 subjek (20%). Terdapat korelasi negatif kuat antara ekspresi CD44 dengan respons terapi (Spearman test $r_s = -0,903$ dan $p = 0,000$). Analisis kurva ROC mendapatkan nilai *cut off* 37,00 dan 76,00 dengan nilai akurasi sebesar 86,67 %. Juga terdapat korelasi negatif kuat antara ekspresi ALDH1 dengan respons terapi (Spearman test $r_s = -0,893$ and $p = 0,000$); dilanjutkan analisis kurva ROC didapatkan nilai *cut off* 55,00 dan 94,00 dengan nilai akurasi sebesar 93,33%. Analisis dengan Spearman didapatkan hubungan korelasi kuat antara ekspresi CD44 dengan ALDH1 ($r_s = 0,907$ dan $p = 0,000$). ALDH1 merupakan prediktor yang lebih baik daripada CD44 (*beta coefficient* CD44 = $-0,389$; ALDH1 = $-0,551$). Ekspresi CD44 dan ALDH1 (penanda sel punca kanker) dapat dipakai sebagai prediktor respons kemoterapi neoadjuvan cisplatin pada kanker serviks IIB. ALDH1 merupakan prediktor yang lebih baik daripada CD44.

Kata Kunci: kemoterapi neoadjuvan, cisplatin, RECIST, CD44, ALDH1

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan kanker ginekologi terpenting di dunia.¹ Tahun 2013, berdasarkan data statistik dunia, kanker serviks menduduki urutan terbanyak keempat setelah kanker payudara, kolorektal, dan paru. Data dari Poli Onkologi dan Ginekologi (POSA) RSUD Dr. Soetomo, 2015, menunjukkan jumlah total 729 kasus baru dan 8.907 kasus lama kanker serviks semua stadium. Sedangkan pada stadium IIB didapatkan 217 kasus baru dan 3.797 kasus lama, yang berarti prosentase kanker serviks stadium II B berkisar 30% dari seluruh kasus.

Pada kanker serviks stadium II B, III, dan IV A (stadium lanjut), pengobatan terpilihnya adalah radioterapi lengkap, yaitu radiasi eksterna (*External Beam Radiation Therapy/EBRT*), dilanjutkan radioterapi intrakaviter (*brachithrapy*) konkomitan dengan

kemoterapi.^{2,3} Di RS Dr. Soetomo, pada stadium II B diberikan kemoterapi neoadjuvan dan dilakukan evaluasi operabilitas pasca-kemoterapi. Bila evaluasi dinyatakan memungkinkan (*operable*) maka dilanjutkan pembedahan primer histerektomi radikal dan limfadenektomi kelenjar getah bening.⁴ Pemberian kemoterapi neoadjuvan memungkinkan kanker serviks stadium II B dapat dilakukan pembedahan dengan kemungkinan menghindari pemberian radioterapi. Pada kondisi pelayanan radioterapi yang mengalami antrean pelayanan lama, hal ini akan sangat membantu mortalitas pasien kanker serviks stadium lanjut. Pemberian kemoterapi neoadjuvan pada beberapa penelitian memberikan hasil yang bervariasi. Keberhasilan kemoterapi neoadjuvan sangat dipengaruhi oleh jenis kemoterapi yang diberikan.² Di RS Dr. Soetomo, pada stadium II B diberikan kemoterapi neoadjuvan dengan regimen cisplatin 50 mg/m² selama 4 kali pemberian tiap selang waktu 7 hari.⁴ Muncul pertanyaan: mengapa pada kanker serviks setelah mendapatkan kemoterapi memiliki respons yang bervariasi? Metode untuk memprediksi apakah seseorang penderita kanker serviks mengalami respons terapi pada kemoterapi adjuvan menjadi hal yang penting, mengingat efek samping kemoterapi, waktu, dan biaya.

Banyak penelitian menyimpulkan bahwa populasi sel kanker memiliki hirarki layaknya sel normal. Tingkat tertinggi dari hirarki sel kanker ditempati oleh subpopulasi sel yang terbukti memiliki potensi untuk melakukan pembelahan secara identik (*self renewal*) seperti sel punca normal.⁵ Subpopulasi sel tersebutlah yang diduga bertanggung jawab terhadap terjadinya pertumbuhan kanker, kekambuhan, serta proses resistansi terhadap kemoterapi dan radiasi. Subpopulasi sel tersebut dinamakan sel punca kanker/*Cancer Stem Cells* (CSC).^{5,6,7} Mekanisme pasti resistansi kemoterapi cisplatin pada kanker serviks belum jelas. Beberapa peneliti membuktikan bahwa kejadian seperti ini disebabkan sel punca kanker yang tetap bertahan hidup pasca-kemoterapi.⁸ Keberadaan sel punca kanker serviks ditunjukkan oleh CD44 dan ALDH1.⁹ Penelitian ini membuktikan terdapat hubungan antara ekspresi CD44 dan ALDH1 sebagai penanda sel punca kanker dengan respons kemoterapi neoadjuvan cisplatin pada kanker serviks stadium II B; serta terdapat korelasi antara peningkatan ekspresi CD44 dan ALDH1 (penanda sel punca kanker) terhadap resistansi kemoterapi neoadjuvan cisplatin pada kanker serviks stadium IIB.

MATERI DAN METODE

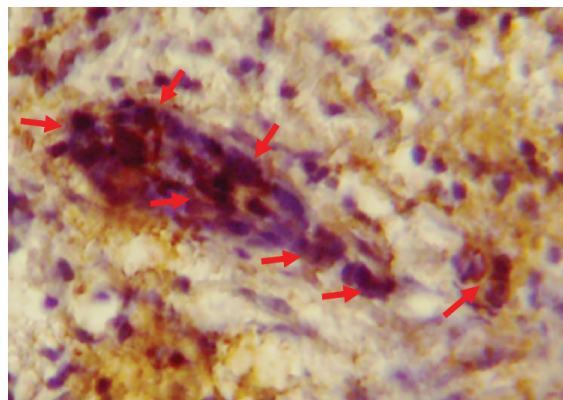
Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional dengan bentuk prospektif yang dilakukan di Poli Onkologi Ginekologi dan Instalasi Rawat Inap Obstetri/Ginekologi RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, mulai Desember 2016 sampai Mei 2017, sebanyak 30 subjek. Populasi penelitian adalah pasien kanker serviks stadium IIB, mendapat pengobatan kemoterapi neoadjuvant cisplatin 50 mg/m² sebanyak 4 kali, dan belum pernah mendapatkan kemoterapi serta radiasi sebelumnya. Kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia CD44 dan ALDH1 di Laboratorium Mikroskop Elektron Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Selanjutnya, pasien dilakukan pemeriksaan MRI untuk mengukur volume serviks dan parametrium. Pasien diberikan kemoterapi neoadjuvant cisplatin 50 mg/m² tiap minggu sebanyak 4 kali. Kemudian, 2–3 minggu setelah kemoterapi dilakukan pemeriksaan MRI ulang atau pemeriksaan secara klinis untuk mengukur volume tumor, lalu dibandingkan sebelum dan setelah kemoterapi. Kit antibodi primer yang digunakan: untuk CD44 dengan Anti-CD44 antibodi [EPR1013Y] dan untuk ALDH1 dengan Anti-ALDH1A1 antibodi [EP1933Y]. Kit antibodi sekunder yang digunakan adalah Diaminobenzidine (DAB).

Prosedur Pengecatan IHC

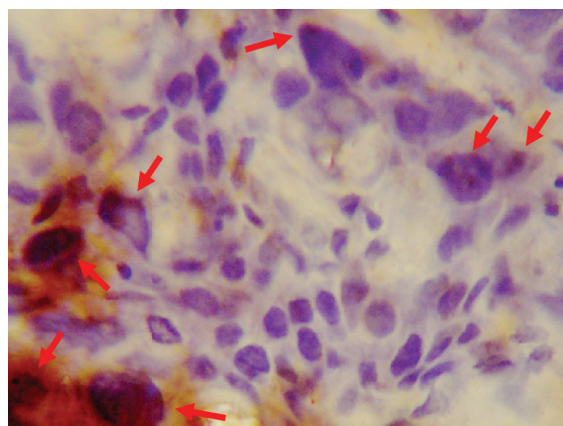
Potongan sampel jaringan serviks diletakkan di slide, objek glass direndam Xylol selama 3–5 menit (4 kali), dilanjutkan ethanol absolut selama 1–3 menit (3 kali), ethanol 70 selama 1–3 menit (2 kali), serta dicuci 3 kali menggunakan Aquabidest. Bersihkan pinggir slide dengan tisu. Teteskan **H2O2 3%** inkubasi suhu kamar selama 10 menit, lalu cuci 3 kali PBS, dan bersihkan pinggir slide dengan tisu. Teteskan **Trypsin 0,025%** inkubasi suhu 37°C selama 6 menit serta cuci 3 kali PBS, bersihkan pinggir slide dengan tisu. Teteskan **Ultra V Block**, inkubasi suhu kamar selama 5 menit, serta bersihkan pinggir slide (tidak perlu dicuci). Teteskan **monoklonal** (Anti-CD44 antibodi [EPR1013Y] atau Anti-ALDH1A1 antibodi [EP1933Y]) yang sudah diencerkan (1 : 100), dilanjutkan inkubasi suhu kamar ± 25–30 menit, cuci PBS 3 kali, lalu bersihkan pinggir slide dengan tisu. Teteskan **Biotinilated**, inkubasi suhu kamar selama 10 menit, serta cuci PBS 3 kali, lalu bersihkan pinggir slide dengan tisu. Teteskan HRP Polymer, inkubasi suhu kamar selama 10 menit, cuci PBS tiga kali, lalu bersihkan pinggir slide dengan tisu. Teteskan DAB chromogen (20µl/1 ml substrat), inkubasi suhu kamar selama 5–15 menit (*dark room*), cuci Aquabidest 3 kali, lalu bersihkan. Pengecatan dengan Meyer Hematoxylin

inkubasi suhu kamar selama 6–15', serta cuci air mengalir 3 kali. Pencucian terakhir direndam dalam air selama 10 menit. Keringkan, lalu *Mounting*.

Selanjutnya, lakukan pembacaan pada 10 lapangan pandang pembesaran 400 x (625 µ²/lap) dengan mikroskop elektron tipe Leica DM750, kemudian hasil dijumlahkan. Ekspresi CD44 diamati pada membran sel sebagai bagian kecil dari sel-sel kanker yang positif di daerah tumor secara keseluruhan. Sel CD44 positif akan memberikan reaksi positif terhadap anti-CD44 dengan pewarnaan IHC. Lapisan luar membran sel, sitoplasma, dan daerah ekstraselular sekitar membran sel akan menunjukkan warna kecoklatan (lihat gambar 1). Ekspresi ALDH1 diamati pada lapisan dalam sel sebagai bagian kecil dari sel-sel kanker yang positif di daerah tumor secara keseluruhan. ALDH1 positif akan memberikan reaksi positif terhadap anti-ALDH1 dengan pewarnaan IHC pada lapisan dalam membran sel, sitoplasma (lihat gambar 2).



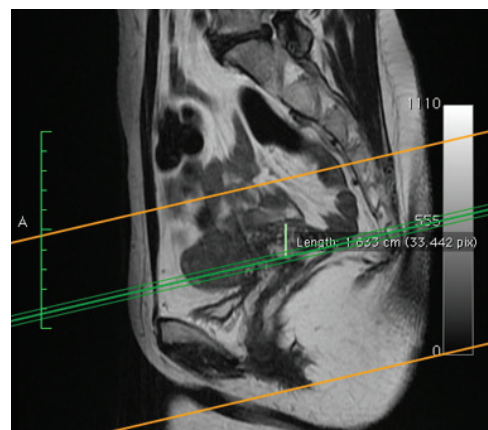
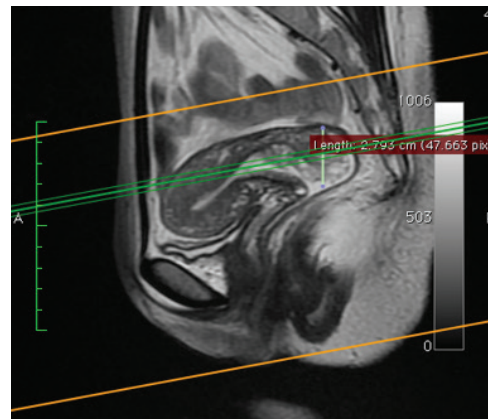
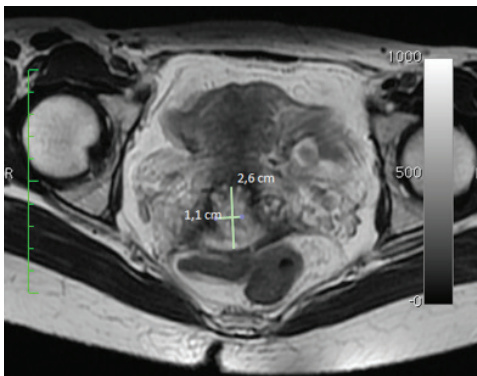
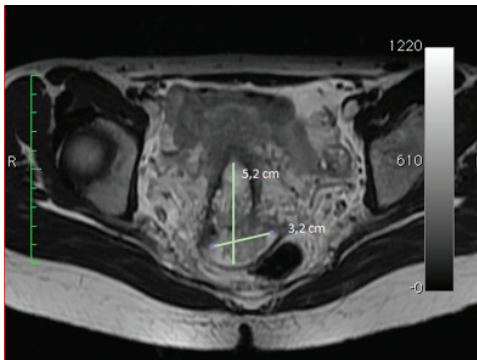
Gambar 1: Foto pemeriksaan IHC CD 44 pada pembesaran 400 kali subjek nomor 13



Gambar 2: Foto pemeriksaan IHC ALDH1 pada pembesaran 400 kali pada subjek nomor 25

Respons Klinik

Respons klinik dinilai setelah pemberian kemoterapi neoadjuvan cisplatin 4 seri dan dievaluasi secara klinis oleh dokter peneliti menggunakan MRI. Hasil respons terapi dibagi menjadi: *Pertama, Complete responsse* (CR) adalah hilangnya semua lesi, baik pada target maupun non-target, dan kadar petanda tumor normal. *Kedua, partial responsse* (PR) yaitu hilangnya semua lesi target tanpa progresivitas lesi non-target, tanpa pertumbuhan lesi baru dengan menetapnya kadar petanda tumor yang abnormal, atau sedikitnya pengurangan diameter terpanjang tumor target sebesar 30% tanpa progresivitas lesi non-target dan tanpa pertumbuhan lesi baru. *Ketiga, progressive disease* (PD) yaitu sedikitnya peningkatan diameter terpanjang lesi target sebesar 20% atau terdeteksinya 1 atau lebih lesi baru, atau terdapat progresivitas lesi non-target. *Keempat, stable disease* (SD), yaitu tidak memenuhi kriteria PR maupun PD dan tidak terdeteksinya lesi baru, baik pada target maupun non-target. Pemeriksaan dengan MRI, standar diameter yang diukur (anteroposterior, craniocaudal, dan laterolateral) serta volume tumor dikalkulasi dengan formula ellipsoid, $\text{volume} = \text{diameter AP} \times \text{CC} \times \text{LL} \times \pi/6$.



Gambar 3: Hasil pemeriksaan MRI subjek nomor 2. Ny. EK. Sebelum (A,C) dan sesudah (B,D) kemoterapi adjuvan cisplatin.

Gambar 3 memperlihatkan contoh hasil pemeriksaan MRI pada subjek nomor 2, Ny. EK. Sebelum NAC (gambar A) ukuran AP 5,2 cm LL 3,2 cm dan sesudah NAC (gambar B) AP 2,6 cm LL 1,1 cm. Sebelum NAC (gambar C) ukuran CC 2,7 cm dan sesudah NAC (gambar D) CC 1,6 cm. Perhitungan: dimensi kanker serviks sebelum NAC 2,7 x 5,2 x 3,2 volume 23,52 cm³; dimensi kanker serviks sesudah NAC 1,6 x 2,6 x 1,1 volume 2,41 cm³ sehingga selisih volume minus 21,11 cm³ atau minus 89,7%. Sedangkan perbedaan diameter terpanjang (5,2–2,6 cm) 2,6 cm (minus 50%), dikatakan subjek mengalami *partial response*.

HASIL

Dari 30 subjek penelitian, umur termuda 34 tahun, umur tertua 67 tahun, dengan rata rata umur subjek penelitian 48,5 tahun. Penderita kanker serviks II B yang terbanyak adalah kelompok umur 45 sampai 54 tahun, yaitu 36,7%. Jumlah paritas subjek penelitian memiliki rentang 0 sampai 7, dengan jumlah paritas

terbanyak adalah 3 atau 33,3%. Hasil histopatologis terbanyak adalah jenis *squamous carcinoma*, yaitu 66,7%. Lihat tabel 1.

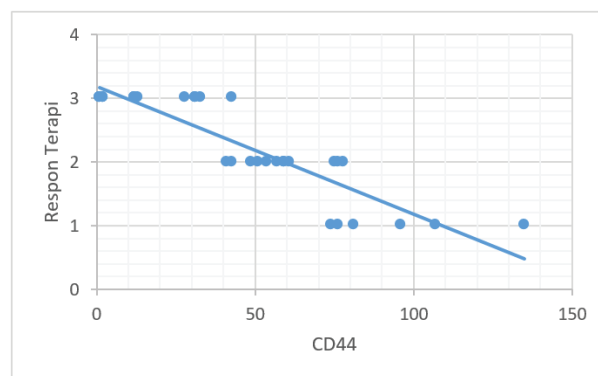
Didapatkan distribusi respons terapi: tidak didapatkan subjek yang mengalami CR, PR sebanyak 40%, SD sebanyak 40%, dan PD sebanyak 20%. Analisis volume serviks sebelum NAC didapatkan nilai minimum 3,72 cm³ dan nilai maksimum 131,21 cm³ dengan nilai rerata 38,03 cm³. Volume serviks sesudah NAC didapatkan nilai minimum 0,63 cm³ dan nilai maksimum 113,66 cm³ dengan nilai rerata 29,08 cm³.

Tabel 1: Karakteristik klinik penderita kanker serviks berdasarkan umur, paritas, dan histopatologi

Karakteristik klinik	Frekuensi	(%)
Umur (tahun)		
<35	1	3,3
35 – 44	10	33,3
45 – 54	11	36,7
55 – 64	6	20
>65	2	6,7
Paritas		
0	1	3,3
1	5	16,7
2	9	30
3	10	33,3
4	1	3,3
>4	4	13,4
Histopatologis		
<i>Squamous carcinoma</i>	20	66,7
<i>Adeno carcinoma</i>	4	13,3
<i>Adenosquamous carcinoma</i>	6	20

Hubungan Respons Terapi dengan Ekspresi CD44

Data ekspresi CD44 pada masing-masing kelompok respons terapi berdistribusi normal (Shapiro-Wilk $p > 0,05$). Uji komparasi dengan Anova satu arah didapatkan adanya perbedaan antar-kelompok ($p < 0,05$). Perbedaan tersebut terdapat antar-semua kelompok respons terapi. Dengan analisis korelasi Spearman didapatkan hasil analisis $r_s = -0,903$ dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Hasil analisis tersebut menunjukkan adanya hubungan negatif kuat antara ekspresi CD44 dengan respons terapi Cisplatin (lihat gambar 4).



Keterangan: Respon Terapi

1 = *Progressive disease*; 2 = *Stable disease*; 3 = *Partial response*

Gambar 4: Korelasi ekspresi CD44 dengan respons terapi

Analisis lebih lanjut dengan kurva ROC diperoleh nilai *cut off* sebesar 37,00 dan 76 (75,50). Berdasarkan nilai *cut off* tersebut didapatkan distribusi respons terapi berdasarkan kategori ekspresi CD44 (lihat Tabel 2).

Tabel 2: Hubungan respons terapi dengan ekspresi CD44 dengan *cut off* 37 dan 76

Kategori ekspresi CD44	Progresif Disease	Respon Terapi Stable Disease	Partial Response	Total
<37	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11 (100,0%)	11 (36,67%)
37 – <76	1 (8,3%)	10 (83,3%)	1 (8,3%)	12 (40,0%)
≥76	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0 (0,0%)	7 (23,33%)
Total	6 (20,0%)	12 (28,6%)	12 (40,0%)	30 (100,0%)

Exact Probability = 0,000

Respons terapi dikategorikan menjadi dua, yaitu respons terapi negatif (bila respons terapi berupa SD dan PD; dan respons terapi positif (bila respons terapi berupa PR dan CR). Didapatkan *cut off* ekspresi CD44 sebesar 37. Berdasarkan nilai *cut off* tersebut didapatkan distribusi respons terapi berdasarkan kategori ekspresi CD44 (lihat tabel 3).

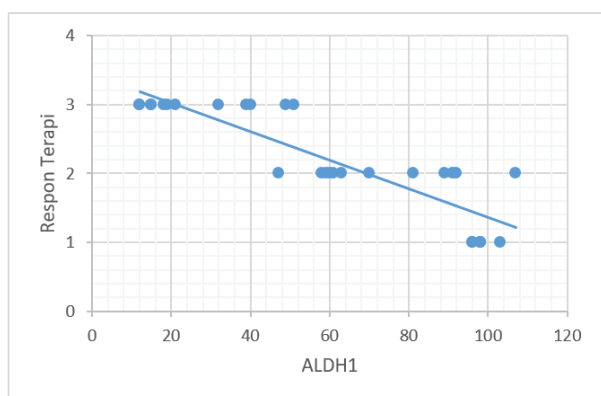
Tabel 3: Hubungan respons terapi dengan ekspresi CD44 dengan *cut off* 37

Kategori ekspresi CD44	Respon Terapi		Total
	Positif	Negatif	
<37	11 (100,0%)	0 (0,0%)	11 (36,67%)
≥37	1 (5,3%)	18 (94,7%)	19 (63,33%)
Total	12 (40,0%)	18 (60,0%)	30 (100,0%)

Fisher's exact $p = 0,000$

Hubungan Respons Terapi dengan Ekspresi ALDH1

Data ekspresi ALDH1 pada masing-masing kelompok respons terapi progresif tidak berdistribusi normal (Shapiro-Wilk $p < 0,05$), sedangkan pada kelompok *stable disease* dan *partial response* berdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji komparasi dengan uji Kruskal-Wallis didapatkan adanya perbedaan antar-kelompok ($p < 0,05$). Perbedaan tersebut terdapat pada antar-semua kelompok respons terapi. Dengan analisis korelasi Spearman didapatkan hasil analisis $r_s = -0,893$ dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Hasil analisis tersebut menunjukkan adanya hubungan negatif kuat antara ekspresi ALDH1 dengan respons terapi terhadap Cisplatin (lihat gambar 5).



Keterangan: Respon Terapi

1 = Progressive disease; 2 = Stable disease; 3 = Partial response

Gambar 5: Korelasi ekspresi ALDH1 dengan respons terapi

Analisis lebih lanjut dengan kurva ROC diperoleh nilai *cut off* sebesar 55 (54,50) dan 94,0. Berdasarkan nilai *cut off* tersebut didapatkan distribusi respons terapi berdasarkan kategori ekspresi ALDH1 (lihat tabel 4).

Tabel 4: Hubungan respons terapi dengan ekspresi ALDH1 dengan *cut off* 55 dan 94

Kategori ekspresi ALDH1	Progresif Disease	Respon Terapi Stable Disease	Partial Response	Total
<55	0 (0,0%)	1 (7,7%)	12 (92,3%)	13 (43,3%)
55 – <94	0 (0,0%)	10 (100,0%)	0 (0,0%)	10 (33,3%)
≥94	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	7 (23,33%)
Total	6 (20,0%)	12 (28,6%)	12 (40,0%)	30 (100,0%)

Exact Probability = 0,000

Bila respons terapi dikategorikan menjadi dua, didapatkan *cut off* ekspresi ALDH1 sebesar 55 (54,50%).

Berdasarkan nilai *cut off* tersebut didapatkan distribusi respons terapi berdasarkan kategori ekspresi ALDH1 (lihat tabel 5).

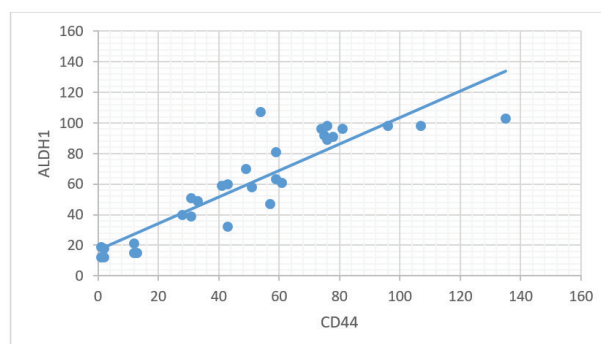
Tabel 5: Hubungan respons terapi dengan ekspresi ALDH1 dengan *cut off* 55

Kategori ekspresi ALDH1	Respon Terapi		Total
	Positif	Negatif	
<55	12 (92,3%)	1 (7,7%)	11 (36,67%)
≥55	0 (0,0%)	17 (100,0%)	19 (63,3%)
Total	12 (40,0%)	18 (60,0%)	30 (100,0%)

Chi Square corrected $p = 0,000$

Hubungan Korelasi CD44 dengan ALDH1

Analisis dengan korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi yang kuat antara ekspresi CD44 dengan ekspresi ALDH1 ($r_s = 0,907$, $p = 0,000$). Semakin tinggi ekspresi CD44, semakin tinggi ekspresi ALDH1 (lihat gambar 6).



Gambar 6: Korelasi ekspresi CD44 terhadap ALDH1

Analisis dengan regresi kategorikal menunjukkan ALDH1 merupakan prediktor yang baik untuk respons terapi terhadap Cisplatin, di mana didapatkan koefisien beta CD44 sebesar $-0,389$ (nilai $p = 0,087$) dan ALDH1 sebesar $-0,551$ (nilai $p = 0,018$).

PEMBAHASAN

Uji komparasi dengan Anova satu arah didapatkan adanya perbedaan antar-kelompok ($p < 0,05$). Perbedaan tersebut terdapat pada antar-semua kelompok respons terapi. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi CD44 berbeda secara bermakna pada semua kelompok respons terapi cisplatin pada kanker serviks IIB. Jalur apoptosis melalui jalur intrinsik (*mitochondrial*

pathway) menurun di dalam sel punca kanker. Ekspresi tinggi CD44 menginduksi ERK, selanjutnya Akt serta meningkatkan jumlah protein pro-survival BCL 2 dengan akibat menghambat protein pro-apoptosis BAX BAK. Proses ini menghambat keluarnya sitokrom C dari mitokondria, menghambat pembentukan apoptosom, dan menyebabkan sel dapat bertahan dari apoptosis, bahkan dapat berproliferasi.¹⁰ Jalur kanonikal parakrin Wnt/ β -catenin yang positif akan membuat β -catenin aktif dan masuk ke dalam nukleus. Protein β -catenin berperan sebagai faktor transkripsi terhadap sintesis protein Oct-4. Oct-4 merupakan suatu faktor transkripsi yang terdapat di dalam nukleus sel punca kanker serviks. Keberadaan Oct-4 menunjukkan bahwa sel berada pada fase pluripoten yang mengalami proses *self renewal*. Hal ini merupakan ciri khas dari CSC, selanjutnya Oct-4 akan bertindak sebagai faktor transkripsi sintesis CD44. Pada CSC kanker serviks, jalur Wnt/ β -catenin memicu reaksi jalur *signaling* CD44.¹¹ Penelitian ini membuktikan bahwa jaringan kanker serviks mengandung sel punca kanker dan CD44 sebagai penanda sel punca kanker (*cancer stem cells*) pada kanker serviks.

Dengan analisis korelasi Spearman didapatkan hasil analisis $r_s = -0,903$ dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Hasil analisis tersebut menunjukkan adanya hubungan negatif kuat antara ekspresi CD44 dengan respons terapi cisplatin. Semakin tinggi ekspresi CD44, semakin kemoresistan cisplatin. Pada penelitian ini, penulis mencoba mencari nilai kuantitatif banyaknya ekspresi CD44. Analisis lebih lanjut dengan kurva ROC diperoleh nilai *cut off* sebesar 37 dan 76. Akurasi dari penggunaan kategori ekspresi CD44 sebagai prediktor respons terapi terhadap cisplatin adalah sebesar 86,67%. Jadi, ketepatan prediksi respons terapi (PD, SD, dan PR) kanker serviks IIB bila diberikan kemoterapi terapi cisplatin dengan mengukur besaran ekspresi CD44 pada *cut off* 37 dan 76 adalah 86,67%. Bila respons terapi dikategorikan menjadi dua, yaitu respons terapi negatif dan respons terapi positif, didapatkan *cut off* ekspresi CD44 sebesar 37, di mana didapatkan 12 subjek (40%) mengalami respons terapi positif dan 18 (60%) mengalami respons terapi negatif. Penggunaan CD44 sebagai prediktor respons terapi (2 kategori) menghasilkan akurasi sebesar 96,77%; dengan sensitivitas sebesar 91,67% dan spesifisitas 100%.

Uji komparasi dengan uji Kruskal-Wallis didapatkan adanya perbedaan antar-kelompok ($p < 0,05$). Perbedaan tersebut terdapat pada antar-semua kelompok respons terapi. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi

ALDH1 berbeda secara bermakna pada semua kelompok respons terapi cisplatin pada kanker serviks IIB. Enzim ALDH menunjukkan berbagai fungsi biologis, termasuk detoksifikasi seluler. ALDH1/Aldehyde dehydrogenase 1 termasuk kelompok enzim sitosolik yang berperan pada proses oksidasi intraseluler aldehyde dan berkontribusi pada oksidasi retinol menjadi asam retinoic pada awal diferensiasi sel punca.^{12,13,14,15} ALDH1 sebagai enzim sitosolik dan isoformnya dapat berada di mitokondria dan berfungsi sebagai sitosol yang melakukan detoksifikasi *aquated* cisplatin sehingga efektivitas terapi cisplatin menurun. Saat *aquated* cisplatin masuk ke dalam dan membentuk *cisplatin-DNA adduct* serta dikenali sebagai suatu kerusakan, maka sel punca kanker yang mempunyai sifat *self renewal* melalui *Checkpoint kinase* 1/2 (Chk1/2 kinase) yang aktif memberhentikan siklus sel untuk memberikan waktu DNA *repair* serta melalui mekanisme Wnt signal pathway, akan memperbaiki kerusakan DNA. Hal ini menyebabkan sel tetap dalam kondisi hidup dan masih mampu melakukan proliferasi sel.

Penelitian ini membuktikan bahwa jaringan kanker serviks mengandung sel punca kanker dan ALDH1 sebagai penanda sel punca kanker (*cancer stem cells*) pada kanker serviks. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Takahashi (2007), Bartolomei (2010), Yao (2011), dan Li (2011) yang membuktikan ALDH1 sebagai penanda sel punca kanker serviks.^{16,17} Penelitian ALDH1 dapat digunakan sebagai penanda CSC pada jaringan kanker, di mana secara normal tidak tinggi ekspresi ALDH-nya, contoh payudara, paru paru, colon, dan epitel lambung.¹⁵

Dengan analisis korelasi Spearman didapatkan hasil analisis $r_s = -0,893$ dan $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Hasil analisis tersebut menunjukkan adanya hubungan negatif kuat antara ekspresi ALDH1 dengan respons terapi cisplatin. Semakin tinggi ekspresi ALDH1, semakin kemoresistan cisplatin. Pada penelitian ini berarti ekspresi ALDH1 yang semakin tinggi menjadi prediktor respons terapi kemoterapi cisplatin pada kanker serviks II B. ALDH1 ekspresi tinggi terlihat di kelompok pasien dengan rekurensi atau metastase kanker.^{12,13,14,15} Pada penelitian kanker payudara, didapatkan ALDH1 positif tinggi memiliki *overall survival* yang rendah setelah pemberian paclitaxel – epirubicin dibandingkan dengan yang ALDH1 rendah. Hal ini juga terjadi pada kanker primer prostat. Ekspresi ALDH1 juga dapat dipakai sebagai indikator survival yang jelek pada post-operasi reseksi kanker pankreas stadium awal.¹⁸ Hou (2015) membuktikan bahwa ALDH1 yang tinggi terekspresikan

pada 72,7% dibandingkan ALDH1 yang rendah sebesar 27,3% pada kelompok subjek yang mengalami rekurensi. Hal ini berbanding terbalik dengan kelompok subjek yang tidak mengalami rekurensi, di mana ekspresi tinggi ALDH1 didapatkan 38,9% dan ekspresi rendah didapatkan 61,1%. Kedua hubungan ini memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik ($p = 0,028$).¹⁹

Pada penelitian ini penulis mencoba mencari nilai kuantitatif banyaknya ekspresi ALDH1. Analisis lebih lanjut dengan kurva ROC diperoleh nilai *cut off* sebesar 55 dan 94. Akurasi dari penggunaan kategori ekspresi ALDH1 sebagai prediktor respons terapi terhadap cisplatin sebesar 93,33%. Jadi, ketepatan prediksi respons terapi (PD, SD, dan PR) kanker serviks IIB bila diberikan kemoterapi terapi cisplatin dengan mengukur besaran ekspresi ALDH1 pada *cut off* 55 dan 94 adalah 93,33%. Bila respons terapi dikategorikan menjadi 2, yaitu respons terapi negatif dan respons terapi positif, didapatkan *cut off* ekspresi ALDH1 sebesar 55 (54,50). Berdasarkan nilai *cut off* tersebut didapatkan distribusi respons terapi berdasarkan kategori ekspresi ALDH1 sebagai berikut: didapatkan 12 subjek (40%) mengalami respons terapi positif dan 18 (60%) mengalami respons terapi negatif. Penggunaan ALDH1 sebagai prediktor respons terapi (2 kategori) menghasilkan akurasi sebesar 96,77% dengan sensitivitas sebesar 100,00% dan spesifisitas 94,44%.

Analisis dengan korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi yang kuat antara ekspresi CD44 dengan ekspresi ALDH1 ($r_s=0,907$, $p=0,000$). Semakin tinggi ekspresi CD44, semakin tinggi ekspresi ALDH1. Pada penelitian ini, besaran ekspresi CD44 terendah yaitu satu terdapat dua subjek dan kedua mengalami respons terapi PR. Besaran ekspresi CD44 tertinggi yaitu 135 mengalami respons terapi PD. Sedangkan pada besaran ekspresi ALDH1 terendah yaitu 12 terdapat dua subjek dan keduanya mengalami respons terapi PR; besaran ekspresi CD44 tertinggi yaitu 107 mengalami respons terapi SD. Terdapat perbedaan respons terapi pada saat didapatkan ekspresi tertinggi antara CD44 dengan ALDH1. Pada enam subjek yang mengalami respons terapi PD, nilai ekspresi CD44 dan ALDH1 adalah 74–96, 81–96, 135–103, 76–98, 107–98, dan 96–98. Pada ekspresi CD44 dengan *cut off* 37 dan 76, didapatkan satu subjek di bawah nilai 76; sedangkan pada ekspresi ALDH1 dengan *cut off* 55 dan 94, semua subjek di atas nilai 94. Demikian juga pada dua belas subjek yang mengalami respons terapi PR. Nilai

ekspresi CD44 dan ALDH1 adalah 43–32, 12–15, 2–18, 13–15, 28–40, 2–12, 33–49, 12–21, 1–19, 1–12, 31–39, dan 31–51. Pada ekspresi CD44 dengan *cut off* 37 dan 76, didapatkan satu subjek di atas nilai 37; sedangkan pada ekspresi ALDH1 dengan *cut off* 55 dan 94, semua subjek di bawah nilai 55.

Terdapat empat subjek yang tidak sesuai prediksi bila diterapkan nilai *cut off*. *Pertama*, subjek nomor 1 yang mengalami PR dengan nilai ekspresi CD44 dan ALDH1 yaitu 43 dan 32, yang bilamana melihat ekspresi CD44 di atas nilai 37 idealnya subjek diprediksi mengalami SD. *Kedua*, subjek nomor 17 yang mengalami SD dengan nilai ekspresi CD44 dan ALDH1, yaitu 54 dan 107. Bila melihat ekspresi ALDH1 di atas nilai 94 idealnya subjek diprediksi mengalami PD. *Ketiga*, subjek nomor 28 yang mengalami SD dengan nilai ekspresi CD44 dan ALDH1 yaitu 78 dan 91, yang bila melihat ekspresi CD44 di atas nilai 76 idealnya subjek diprediksi mengalami PD. *Keempat*, subjek nomor 15 yang mengalami PD dengan nilai ekspresi CD44 dan ALDH1 74 dan 196, yang bila melihat ekspresi CD44 di bawah nilai 76 idealnya subjek diprediksi tidak mengalami PD, tetapi mengalami SD.

Analisis dengan regresi kategorikal menunjukkan ALDH1 merupakan prediktor yang lebih baik untuk respons terapi terhadap Cisplatin (*beta coefficient* CD44 = -0,389, ALDH1 = -0,551). Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa ALDH1 merupakan prediktor yang lebih baik dibandingkan dengan CD44 untuk memprediksi respons kemoterapi neoadjuvant cisplatin pada kanker serviks uteri stadium IIB. Penelitian pada kanker kolon didapatkan peningkatan perkembangan tumor sebesar 10 fold bila didapatkan positif pada CD44 dan ALDH1.¹⁸ Penelitian Hou (2015) pada kanker serviks jenis *squamous cell carcinoma* membuktikan bahwa ekspresi ALDH1 merupakan prediktor independen rekurensi dan *overall survival*. Ekspresi ALDH1 tinggi dengan rendah didapatkan *overall survival* dengan hazard ratio 3,805 ($p = 0,013$) dan *recurrence free survival* dengan hazard ratio 4,261 ($p = 0,003$).¹⁹

KESIMPULAN

Eksresi CD44 dapat dipakai sebagai prediktor respons kemoterapi neoadjuvant cisplatin pada kanker serviks II B, dengan korelasi negatif kuat. Ekspresi ALDH1 dapat dipakai sebagai prediktor respons kemoterapi neoadjuvant cisplatin pada kanker serviks II B, dengan korelasi negatif kuat.

Eksresi ALDH1 lebih baik dibandingkan dengan ekspresi CD44 sebagai prediktor respons kemoterapi neoadjuvant cisplatin pada kanker serviks stadium II B.

DAFTAR PUSTAKA

- Jonathan S. Berek, N. F. H. *Berek & Hacker's Gynecologic Oncology*. Wolter Kluwer. 2006
- Andrijono. Sinopsis Kanker Ginekologi. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Edisi ke-4. 2013.
- Benedet, J. L., Bender, H., Jones III, H., Ngan, H. Y. S., & Pecorelli, S. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2000;70:207–312.
- Marten Schilthuis, J Van Der Velden, staff and trainee of Dep Obsgyn Divisi Onkologi RSDS. Protocol of Gynecologic Cancer. 2013
- Dalerba, P, Cho, R.W., & Clarke, M.F. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annual Review of Medicine* 2007;58(1):267–284.
- Milas, L., & Hittelman, W.N. Cancer Stem Cells and Tumor Response to Therapy: Current Problems and Future Prospects. *Seminars in Radiation Oncology* 2009;19(2):96–105.
- Kim, J.K., Jeon, H.Y., & Kim, H. The molecular mechanisms underlying the therapeutic resistance of cancer stem cells. *Archives of Pharmacol Research* 2015; 38(3):389–401.
- Abdullah, L.N., & Chow, E.K.H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine* 2013;2(1):3.
- López, J., Valdez-Morales, F.J., Benítez-Bribiesca, L., Cerbón, M., & Carrancá, A. G. Normal and cancer stem cells of the human female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 2013;11: 53.
- Zöller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer* 2011;11(4):254–267.
- Williams, K., Motiani, K., Giridhar, V., & Kasper, S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Experimental Biology and Medicine* 2013;238:324–338.
- Yao, T., Chen, Q., Zhang, B., Zhou, H., & Lin, Z. The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2011;17(8): HY21-Y26.
- Wang, L., Guo, H., Lin, C., Yang, L., & Wang, X. Enrichment and characterization of cancer stem-like cells from a cervical cancer cell line. *Molecular Medicine Reports* 2014;(1):2117–2123.
- Qi, W., Zhao, C., Zhao, L., Liu, N., Li, X., Yu, W., & Wei, L. Sorting and identification of side population cells in the human cervical cancer cell line HeLa. *Cancer Cell International* 2014;14(1): 3.
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016;7(10).
- Morrison, R., Schleicher, S. M., Sun, Y., Niermann, K. J., Kim, S., Spratt, D. E., ... Lu, B. Targeting the Mechanisms of Resistance to Chemotherapy and Radiotherapy with the Cancer Stem Cell Hypothesis. *Journal of Oncology* 2011; 1–13.
- Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., & Gariglio, P. Embryonic stem cell-specific signature in cervical cancer. *Tumor Biology* 2014;35(3): 1727–1738.
- Januchowski, R., K. Wojtowicz and M. Zabel. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother* 2013;67(7): 669–680.
- Hou, T., Zhang, W., Tong, C., Kazobinka, G., Huang, X., Huang, Y., & Zhang, Y. Putative stem cell markers in cervical squamous cell carcinoma are correlated with poor clinical outcome. *BMC Cancer* 2015;15(1):785.