HUBUNGAN ANTARA *TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES* DENGAN SUBTIPE MOLEKULER KANKER PAYUDARA MENGGUNAKAN ANALISIS *IMAGEJ*

(Skripsi)

Oleh

DEVYA AULIA

2218011055

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026

HUBUNGAN ANTARA *TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES* DENGAN SUBTIPE MOLEKULER KANKER PAYUDARA MENGGUNAKAN ANALISIS *IMAGEJ*

Oleh

DEVYA AULIA

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA KEDOKTERAN

Pada

Jurusan Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026

Judul Skripsi	:	**HUBUNGAN ANTARA *TUMOR INFILTRATING-LYMPHOCYTES* DENGAN SUBTIPE MOLEKULER KANKER PAYUDARA MENGGUNAKAN ANALISIS *IMAGEJ***
Nama Mahasiswa	:	Devya Aulia
No. Pokok Mahasiswa	:	2218011055
Program Studi	:	Pendidikan Dokter
Fakultas	:	Kedokteran

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Dr. dr. Indri Windarti, Sp. PA
NIP 19790128 200604 2000

dr. Risti Graharti, S.Ked., M. Ling
NIP 19900323 202203 2010

2. Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc
NIP 19760120 200312 2001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. dr. Indri Windarti, Sp. PA**

Sekretaris : **dr. Risti Graharti, S.Ked., M. Ling**

Penguji : **dr. Putu Ristyaning Ayu Sangging, M. Kes., Sp. PK., Subsp. H.K(K).**

2. Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc.
NIP 19760120 200312 2001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **08 Januari 2026**

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	: Devya Aulia
NPM	: 2218011055
Program Studi	: Pendidikan Dokter
Judul Skripsi	: Hubungan Antara *Tumor-Infiltarting Lymphocytes* dengan Subtipe Molekular Kanker Payudara Menggunakan Analisis *ImageJ*

Dengan ini menyatakan bahwa karya ilmiah Skripsi ini merupakan **HASIL KARYA SAYA SENDIRI**. Apabila di kemudian hari terbukti adanya plagiarisme dan kecurangan dalam karya ilmiah ini, maka saya bersedia diberi sanksi.

Bandar Lampung, 15 Desember 2025

Mahasiswa,

DEVYA AULIA

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di desa Campang, Kecamatan Gisting pada tanggal 03 Oktober 2003 dan berasal dari Desa Wonoharjo, Kecamatan Sumberejo, Kabupaten Tanggamus, Provinsi Lampung. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Amad Badawi dan Ibu Sulikah. Riwayat pendidikan penulis dimulai dari TK Dharma Wanita Persatuan pada tahun 2009–2010, kemudian melanjutkan pendidikan di SD sejak tahun 2010 hingga 2016. Penulis melanjutkan ke jenjang SMP pada tahun 2016–2019, dan SMA pada tahun 2019–2022. Selama menempuh pendidikan, penulis pernah meraih beberapa prestasi, antara lain Juara 1 Melukis Tingkat Kabupaten saat TK dan SD, serta Juara 3 Bola Voli Tingkat Kecamatan pada jenjang SD. Juara 2 Karate Tingkat Kabupaten dan Juara 1 *Solosong* Tingkat Kecamatan pada jenjang SMP.

Pada tahun 2022, penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Lampung sebagai mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran melalui jalur SNMPTN. Selama menjadi mahasiswa pre-klinik, penulis pernah aktif pada organisasi FSI Ibnu Sina FK Unila sebagai anggota pada tahun 2024-2025.

“Sebuah persembahan sederhana untuk Papa, Mama, Adik, dan Keluarga Besar tercinta”

– playing small making me sick –

SANWACANA

Alhamdulillahirrabilalamin puji syukur senantiasa Penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi dengan judul "HUBUNGAN ANTARA *TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES* DENGAN SUBTIPE MOLEKULER KANKER PAYUDARA MENGGUNAKAN ANALISIS *IMAGEJ*" disusun sebagai pemenuh syarat guna mencapai gelar sarjana di Fakultas Kedokteran di Universitas Lampung.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan, masukan, bantuan, kritik, dan saran dari berbagai pihak. Dengan ini penulis ingin menyampaikan ucapan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
3. Dr. dr. Indri Windarti, S.Ked., Sp.PA., selaku Ketua Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
4. dr. Intanri Kurniati, S.Ked., Sp.PK., selaku Kepala Program Studi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
5. Dr. dr. Indri Windarti, S.Ked., Sp. PA., selaku Pembimbing Pertama sekaligus orang tua kedua penulis yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing, memberikan kritik dan saran yang konstruktif selama proses penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas segala dukungan dan nasihat yang tidak pernah putus diberikan selama proses penyusunan skripsi, penulis sangat menghargai ilmu yang telah dibagikan;
6. dr. Risti Graharti, S. Ked., M. Ling., selaku Pembimbing Kedua, yang bersedia meluangkan waktu dan tenaga, serta dengan sabar memberikan

bimbingan, dukungan, kritik, saran yang membangun dalam penyelesaian skripsi ini. Terima kasih atas segala bimbingan dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis;

7. dr. Putu Ristyaning Ayu Sangging, S.Ked., M. Kes., Sp. PK., Subsp. HK(K)., selaku Pembahas, yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan masukan, kritik, saran, dan pembahasan yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi yang tidak akan pernah saya lupakan. Terima kasih atas arahan dan nasihat yang tidak pernah putus diberikan selama proses penyusunan skripsi ini;
8. Segenap jajaran dosen dan civitas Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, yang telah mendidik dan membantu penulis selama perkuliahan;
9. Kedua orang tua penulis tercinta, Papa Amad dan Mama Ulik. Terima kasih atas doa, kasih sayang, ketulusan, dan dukungan yang tidak pernah berhenti mengiringi setiap langkah dan proses kehidupan penulis. Terima kasih telah menjadi orang tua terbaik dalam mendidik penulis hingga ke tahap ini;
10. Nazwa Kafka Nafisa selaku adik penulis, Makpi, Mas Udin, Mba Yayuk, Mba Nur, Mba Syifa, selaku keluarga penulis. Terima kasih telah senantiasa menguatkan dan mendukung penulis baik dalam bentuk kata, doa, maupun usaha hingga penulis sampai ke tahap ini;
11. Para sahabat terbaik penulis, Aina, Azizah, Meffa, Nabilla, dan Nadine, yang menjadi saksi perjuangan penulis dalam proses perkuliahan. Terima kasih atas segala kebersamaan, suka dan duka yang telah kita lewati bersama. Terima kasih telah saling menguatkan disetiap perjalanan penuh cerita ini;
12. Teman-teman sejawat angkatan 2022 (Troponin-Tropomiosin), terima kasih untuk segala memori indahnya selama 7 semester ini. Semoga perjuangan yang sudah kita lalui dapat membantu kita menjadi dokter yang profesional;
13. Terima kasih kepada segala pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah mendukung dan membantu dalam penyusunan skripsi ini. Terima kasih juga kepada diri saya sendiri yang selalu memilih berusaha dengan jujur dan tidak menyerah sesulit apapun proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberi kebermanfaatan bagi para pembacanya.

Bandar Lampung, 15 Desember 2025
Penulis

DEVYA AULIA

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP BETWEEN TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES AND MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER USING IMAGEJ ANALYSIS

By

DEVYA AULIA

Background: Breast cancer is the most common malignancy in women and remains a major global health burden. Its molecular subtypes, including Luminal A, Luminal B, HER2 positive, and Triple Negative Breast Cancer (TNBC), differ in biological behavior, prognosis, and therapeutic response. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) reflect the host antitumor immune activity and function as important prognostic and predictive biomarkers. Manual assessment often varies between observers, making digital image analysis using ImageJ a more objective alternative. This study aimed to evaluate the relationship between TIL levels and molecular subtypes of breast cancer using ImageJ.
Methods: An analytic observational study using secondary histopathology data. Stromal TILs were quantified on hematoxylin eosin slides through ImageJ using scale calibration, thresholding, and particle analysis. Subtypes were determined based on ER, PR, HER2, and Ki-67. Data were analyzed descriptively and through statistical tests.
Results: TIL levels differed according to molecular subtype. TNBC showed the highest infiltration, followed by HER2 positive, whereas Luminal B and Luminal A exhibited lower TIL percentages. A significant association was found between TIL percentage and molecular subtype.
Conclusions: : ImageJ based quantification demonstrated clear differences in TIL infiltration among breast cancer subtypes. Higher TIL levels in TNBC and HER2 positive groups reflect their more immunogenic characteristics. Digital image analysis offers an objective method for supporting prognostic evaluation.

Keywords: breast cancer, molecular subtype, tumor infiltrating lymphocytes, ImageJ, digital pathology

ABSTRAK

HUBUNGAN ANTARA *TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES* DENGAN SUBTIPE MOLEKULER KANKER PAYUDARA MENGGUNAKAN ANALISIS *IMAGEJ*

Oleh

DEVYA AULIA

Latar Belakang: Kanker payudara merupakan kanker tersering pada wanita dan menjadi masalah kesehatan global dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Subtipe molekuler seperti Luminal A, Luminal B, HER2 positif, dan *Triple Negative Breast Cancer* memiliki karakteristik biologis yang berbeda sehingga memengaruhi prognosis dan respons terapi. *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) mencerminkan aktivitas imun antitumor dan menjadi biomarker penting, terutama pada subtipe yang lebih agresif. Variasi penilaian secara manual mendorong penggunaan analisis citra digital seperti *ImageJ* untuk meningkatkan objektivitas. Penelitian ini bertujuan menilai hubungan TILs dengan subtipe molekuler kanker payudara menggunakan *ImageJ*.

Metode: Penelitian observasional analitik yang menggunakan data histopatologi. Stromal TILs diukur pada preparat hematoksilin eosin menggunakan *ImageJ* melalui kalibrasi skala, *thresholding*, dan *analyze particles*. Subtipe molekuler ditentukan berdasarkan ER, PR, HER2, dan Ki-67. Data dianalisis secara deskriptif dan bivariat.

Hasil: Persentase TILs bervariasi pada tiap subtipe. TNBC memiliki infiltrasi tertinggi, diikuti HER2 positif, sedangkan Luminal B dan Luminal A menunjukkan kadar lebih rendah. Terdapat hubungan bermakna antara persentase TILs dengan subtipe molekuler.

Kesimpulan: Analisis *ImageJ* menunjukkan perbedaan infiltrasi TIL yang signifikan antar subtipe. TNBC dan HER2 positif memiliki infiltrasi lebih tinggi. Metode digital ini memberikan pendekatan objektif untuk mendukung penilaian prognostik.

Kata Kunci: kanker payudara, subtipe molekuler, *tumor infiltrating lymphocytes*, *ImageJ*, patologi digital

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL ..... **i**

DAFTAR GAMBAR ..... **ii**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **iii**

BAB I PENDAHULUAN **1**

1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.3.1 Tujuan Umum 3
1.3.2 Tujuan Khusus 3
1.4 Manfaat Penelitian 3
1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti 3
1.4.2 Manfaat Bagi Masyarakat 4
1.4.3 Manfaat Bagi Institusi 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA **5**

2.1 Kanker Payudara 5
2.1.1 Definisi 5
2.1.2 Epidemiologi Kanker Payudara 5
2.1.3 Etiologi dan Faktor Risiko 6
2.1.4 Patofisiologi 6
2.1.5 Klasifikasi Subtipe Molekuler Kanker Payudara 10
2.1.6 Prognosis dan Penatalaksanaan Berdasarkan Subtipe 13
2.2 *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) 15
2.2.1 Definisi 15
2.2.2 Komponen Seluler TILs 16
2.2.3 Mekanisme Infiltrasi TILs dalam Tumor 16
2.2.4 TILs dalam Kanker Payudara 17
2.2.5 Korelasi TILs dengan Subtipe Molekuler Kanker Payudara 18
2.2.6 TILs sebagai Biomarker Prognostik dan Prediktif 20
2.2.7 Standar Penilaian TILs dalam Praktik Klinis 22
2.2.8 Studi Terkait TILs pada Kanker Payudara 26
2.3 *ImageJ* 29
2.3.1 Definisi dan Sejarah *ImageJ* 29
2.3.2 Fitur dan Fungsi Utama 30
2.3.3 Penerapan dan Studi Terkait dalam Analisis Histopatologi 34

2.3.4 Keunggulan *ImageJ* Dibandingkan Penilaian Manual 37
2.3.5 Tantangan dan Keterbatasan 37
2.4 Kerangka Teori 39
2.5 Kerangka Konsep 40
2.6 Hipotesis Penelitian 40

BAB III METODE PENELITIAN 41

3.1 Metode Penelitian 41
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian 41
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian 41
3.3.1 Populasi Penelitian 41
3.3.2 Sampel Penelitian 41
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian 44
3.4.1 Variabel Bebas (*independent variable*) 44
3.4.2 Variabel Terikat (*dependent variable*) 44
3.5 Kriteria Sampel 45
3.5.1 Kriteria Inklusi 45
3.5.2 Kriteria Eksklusi 45
3.6 Teknik Pengambilan Sampel 45
3.7 Definisi Operasional 45
3.8 Instrumen, dan Bahan Penelitian 45
3.8.1 Instrumen Penelitian 45
3.8.2 Bahan Penelitian 46
3.9 Prosedur dan Alur Penelitian 46
3.9.1 Prosedur Penelitian 46
3.9.2 Alur Penelitian 47
3.10 Manajemen Data 47
3.10.1 Sumber Data 47
3.10.2 Analisis Data 48
3.11 Etika Penelitian 48

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 49

4.1 Gambaran Umum Penelitian 49
4.2 Hasil Penelitian 49
4.2.1 Karakteristik Dasar Sampel Penelitian 49
4.2.2 Analisis Univariat 50
4.2.3 Analisis Bivariat 57
4.3 Pembahasan 58
4.3.1 Karakteristik Dasar Sampel Penelitian 59
4.3.2 Analisis Univariat 62
4.3.3 Analisis Bivariat 67
4.4 Keterbatasan Penelitian 69

BAB V SIMPULAN DAN SARAN 70

5.1 Simpulan Penelitian 70
5.2 Saran 70
5.2.1 Bagi Peneliti Selanjutnya 70

5.2.2 Bagi Klinisi dan Patolog 71
5.2.3 Bagi Institusi Layanan Kesehatan..... 71

DAFTAR PUSTAKA 72

LAMPIRAN 89

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

Tabel 3. 1 Jumlah sampel tiap subtipe 44
Tabel 3. 2 Definisi Operasional..... 45
Tabel 4. 1 Karakteristik Dasar Sampel.....50
Tabel 4. 2 Distribusi Subtipe Molekuler Kanker Payudara..... 51
Tabel 4. 3 Analisis Univariat Subtipe Molekuler Kanker Payudara 57
Tabel 4. 4 Hasil Uji *Kruskal-Wallis H* 57
Tabel 4. 5 Hasil Uji *Mann-Whitney*..... 58

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

Gambar 2. 1 Faktor risiko kanker payudara 6
Gambar 2. 2 Komponen seluler *host immune response* 7
Gambar 2. 3. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif luminal A. 10
Gambar 2. 4. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif luminal B. 11
Gambar 2. 5. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif HER2+ 12
Gambar 2. 6. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif TNBC. 13
Gambar 2. 7. Gambaran klasifikasi, prognosis, dan terapi tiap subtipe molekuler kanker payudara 15
Gambar 2. 8. TILs sebagai biomarker: grafik prognosis dan hasil klinis 22
Gambar 2. 9. Pendekatan standar evaluasi TILs pada tumor solid 24
Gambar 2. 10. Standardisasi dan pedoman untuk penilaian TILs 25
Gambar 2. 11. Gambar referensi persentase skor sTIL 26
Gambar 2. 12. Diagram evolusi *ImageJ* 30
Gambar 2. 13. *Basic concepts of ImageJ* 31
Gambar 2. 14. Fitur *set scale* 32
Gambar 2. 15. Fitur *threshold* 33
Gambar 2. 16. Fitur *analyze particles* 33
Gambar 2. 17. Fitur *measurement* 34
Gambar 2. 18. Evaluasi distribusi TIL di area fibrosis tinggi dan area fibrosis rendah 35
Gambar 2. 19. Pengukuran area stroma dan tumor dengan *ImageJ* untuk perhitungan TSR dan densitas *fiber*. 37
Gambar 2. 20. Kerangka Teori 39
Gambar 3. 1 Alur Penelitian 47
Gambar 4. 1 Kuantifikasi TILs Luminal A 52
Gambar 4. 2 Kuantifikasi TILs Luminal B 53
Gambar 4. 3 Kuantifikasi TILs HER2+ 55
Gambar 4. 4 Kuantifikasi TILs TNBC 56

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Izin Penelitian 90
Lampiran 2. *Ethical Clearance* RSUD Dr. H. Abdul Moeloek 91
Lampiran 3. Dokumentasi Pengambilan Data..... 92
Lampiran 4. Data Penelitian..... 92
Lampiran 5. Analisis *ImageJ*..... 94
Lampiran 6. Hasil Analisis Data Penelitian 96

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara global, kanker payudara merupakan kanker paling umum pada wanita dan menempati peringkat kedua sebagai kanker dengan insidensi terbanyak setelah kanker paru-paru (Sung *et al.*, 2021; Siegel *et al.*, 2023). Menurut WHO, diperkirakan 2,3 juta kasus kanker payudara baru dan 670.000 kematian terkait kanker payudara terjadi di seluruh dunia pada tahun 2022 (WHO, 2024).

Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan pertama terkait jumlah kanker terbanyak serta menjadi salah satu penyebab kematian tertinggi akibat kanker. Berdasarkan data GLOBOCAN tahun 2020, jumlah kasus baru kanker payudara mencapai 68.858 kasus (16,6%) dari total 396.914 kasus baru kanker di Indonesia. Sementara itu, untuk jumlah kematiannya mencapai lebih dari 22.000 jiwa kasus (GLOBOCAN, 2020). Angka ini mencerminkan urgensi penelitian lokal yang fokus pada biomarker prognostik, terutama mengingat keterbatasan akses terhadap diagnostik canggih di negara berkembang, yang sering kali menyebabkan diagnosis stadium lanjut dan mortalitas tinggi (Sung *et al.,*2021).

Secara klinis, terdapat empat subtipe molekuler utama kanker payudara yang didasarkan imunohistokimia pada reseptor gen ER, PR, HER2, dan penanda proliferasi Ki-67 yang diekspresikan oleh kanker, yaitu Luminal A, Luminal B, HER2+, dan TNBC (Shaath *et al.*, 2021). Tingkat TILs pada masing-masing subtipe ini dapat memberikan nilai prognostik dan prediktif pada kanker payudara serta memiliki korelasi dengan respons pengobatan

yang lebih baik, sehingga dapat memandu strategi terapeutik (Ciarka *et al.*, 2024).

*Tumor-Infiltrating Lymphocytes (*TILs) didefinisikan sebagai jumlah semua sel mononuklear, termasuk limfosit dan sel plasma, yang menginfiltrasi jaringan tumor (Valenza *et al.*, 2023). TILs merepresentasikan respons imun host anti-tumor yang sedang berlangsung (El Bairi *et al.*, 2021). Standarisasi TILs oleh Salgado *et al.* (2015) dari International Immuno-Oncology Biomarker Working Group (ITILWG), menunjukkan bahwa TILs tinggi berkorelasi dengan survival lebih baik. Demikian pula, studi oleh Pujani *et al.* (2020) menekankan bahwa penilaian TILs, yang dapat dilakukan secara reproduktif dan ekonomis menggunakan sediaan H&E, berfungsi sebagai indikator kuat respons imun antitumor. Studi oleh Ciarka *et al.* (2024) juga ditemukan bahwa kadar TILs yang tinggi konsisten terkait dengan prognosis lebih baik, respons terapi lebih tinggi, serta peningkatan *disease-free survival* (DFS) dan *overall survival* (OS). Namun, kuantifikasi TILs secara manual pada gambar slide utuh/*whole slide images* (WSIs) membutuhkan banyak tenaga kerja, rentan terhadap bias, dan rentan terhadap ketidakakuratan subjektif (Loi *et al.*, 2019; Rakaee *et al.*, 2023). Untuk mengatasi keterbatasan ini, digunakan perangkat lunak analisis citra seperti *ImageJ*, yang memungkinkan analisis kuantitatif dan objektif terhadap infiltrasi TILs pada jaringan tumor (Rueden *et al.*, 2017; Schroeder *et al.*, 2021).

Penelitian ini secara khusus bertujuan mengidentifikasi hubungan antara tingkat infiltrasi TILs dengan subtipe molekuler kanker payudara menggunakan analisis gambar berbasis *ImageJ*, yang di mana pendekatan ini dapat memberikan data yang lebih jelas mengenai hubungan antara TILs dan subtipe molekuler kanker payudara, serta potensi peran TILs sebagai prediktif dan prognosis penyakit. Dengan demikian, diharapkan penelitian ini dapat memberikan kontribusi dalam menentukan faktor-faktor prognostik dan prediktif yang lebih akurat serta membantu pengembangan

target terapi yang lebih tepat untuk pasien kanker payudara, sehingga pada akhirnya mengurangi mortalitas kanker payudara di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat hubungan antara tingkat *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) dengan subtipe molekuler kanker payudara yang dianalisis menggunakan *ImageJ*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui hubungan antara jumlah *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) dengan subtipe molekuler kanker payudara yang dianalisis menggunakan *ImageJ*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui distribusi persentase *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) pada masing-masing subtipe molekuler kanker payudara berdasarkan analisis *ImageJ*.
2. Mengetahui karakteristik *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) pada masing-masing subtipe molekuler kanker payudara berdasarkan analisis *ImageJ*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan wawasan peneliti mengenai peran *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) dalam subtipe molekuler kanker payudara, serta memberikan pengalaman langsung dalam analisis citra jaringan histopatologis menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Peneliti juga memperoleh pemahaman tentang penerapan metode kuantitatif yang objektif dalam riset biomedis.

1.4.2 Manfaat Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan bisa membantu masyarakat lebih paham tentang peran sistem kekebalan tubuh, khususnya sel-sel *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs), dalam memprediksi perkembangan kanker payudara. Dengan begitu, masyarakat bisa lebih aktif ikut pemeriksaan dini dan upaya pencegahan.

1.4.3 Manfaat Bagi Institusi

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi ilmiah dalam pengembangan ilmu patologi anatomi dan teknologi analisis digital dan menambah kepustakaan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selain itu, hasil penelitian dapat menambah koleksi karya ilmiah institusi serta mendorong penelitian lanjutan di bidang onkologi dan imunologi kanker.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

2.1.1 Definisi

Menurut WHO 2024 kanker payudara adalah suatu neoplasma yang berasal dari sel-sel pada jaringan payudara khususnya di saluran (duktus) atau lobulus yang abnormal tumbuh tak terkendali dan membentuk tumor. Jika tidak ditangani, tumor dapat menyebar ke jaringan payudara di dekatnya (invasi) kemudian menyebar ke kelenjar getah bening atau organ lain di dekatnya (bermetastasis).

2.1.2 Epidemiologi Kanker Payudara

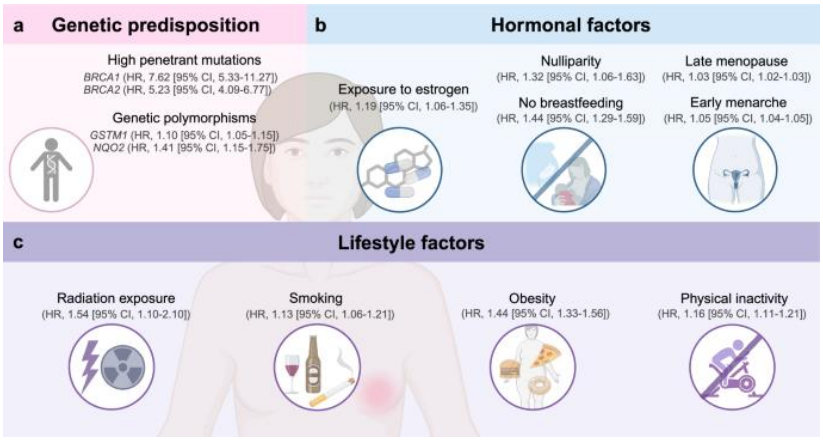
Secara global, kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling umum di kalangan wanita dan menempati peringkat kedua sebagai kanker dengan frekuensi terbanyak setelah kanker paru-paru (Sung *et al.*, 2021; Siegel *et al.*, 2023). Menurut dara yang dilaporkan WHO, diperkirakan 2.3 juta kasus kanker payudara baru dan 670.000 kematian terkait kanker payudara terjadi di seluruh dunia pada tahun 2022 (WHO, 2024).

Analisis baru oleh *International Agency for Research on Cancer* (IARC) menemukan bahwa rata-rata, 1 dari 20 wanita di seluruh dunia akan didiagnosis menderita kanker payudara seumur hidup mereka, dan jika angka saat ini terus berlanjut, pada tahun 2050 akan ada 3,2 juta kasus kanker payudara baru dan 1,1 juta kematian terkait kanker payudara per tahun (Kim *et al*, 2025).

Sedangkan di Indonesia sendiri, kanker payudara menempati urutan pertama terkait jumlah kanker terbanyak serta menjadi salah satu penyumbang kematian pertama akibat kanker. Menurut data GLOBOCAN tahun 2020, jumlah kasus baru kanker payudara mencapai 68.858 kasus (16,6%) dari total 396.914 kasus baru kanker di Indonesia. Sementara itu, untuk jumlah kematiannya mencapai lebih dari 22.000 jiwa kasus.

2.1.3 Etiologi dan Faktor Risiko

Penyebab pasti karsinogenesis kanker payudara belum dapat dipastikan. Namun, sejumlah faktor risiko telah diidentifikasi berperan dalam perkembangan penyakit ini (Smolarz *et al.*, 2021; Łukasiewicz *et al.*, 2021). Faktor risiko utama kanker payudara mencakup jenis kelamin (khususnya perempuan), bertambahnya usia, paparan estrogen dalam jangka waktu lama, warisan genetik, dan pada tingkat yang lebih rendah adalah faktor lingkungan dan gaya hidup (Kumar *et al.*, 2020). Faktor-faktor risiko ini pada akhirnya memicu serangkaian perubahan molekuler dan seluler yang kompleks, yang akan dibahas lebih lanjut dalam patofisiologi kanker payudara.



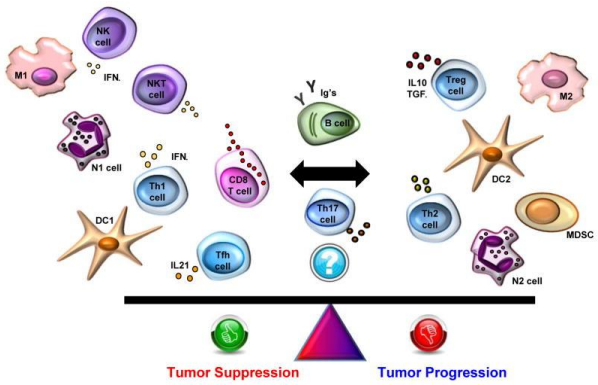
Gambar 2. 1 Faktor risiko kanker payudara
Sumber: Xiong *et al*, 2025

2.1.4 Patofisiologi

Mekanisme pasti perkembangan kanker payudara belum sepenuhnya dipahami. Etiologi kanker payudara melibatkan serangkaian faktor

genetik dan lingkungan yang kompleks yang membentuk lingkungan mikro tumor/*tumor microenvironment* (TME). TME dicirikan oleh interaksi antara sel tumor, sel stroma, dan sel imun, yang selanjutnya memodulasi karsinogenesis (Xiong *et al.*, 2025). Karsinogenesis terjadi karena interaksi kompleks antara faktor risiko genetik dan lingkungan, pengaruh hormonal, dan faktor yang berhubungan dengan pasien (Menon *et al.*, 2025).

Seiring waktu berkembangnya, tumor mampu menyusun mekanisme imunosupresif yang justru membalik keadaan. Sel-sel imun yang awalnya bersifat efektor berubah menjadi imunosupresif, seperti sel Treg FOXP3+, makrofag M2, DC2, dan *myeloid derived suppressor cells* (MDSC), yang menghasilkan sitokin imunorepresif seperti IL-10 dan TGF-β. Akibatnya, sistem imun menjadi toleran terhadap tumor dan kehilangan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan kanker. Komponen seluler dari *host immune response* terhadap tumor, seperti yang ditunjukkan pada *Gambar 2*, dapat mengendalikan pertumbuhan tumor atau berkontribusi pada lingkungan imunosupresif yang mendorong perkembangan tumor (Hendry *et al.*, 2017).



Gambar 2. 2 Komponen seluler *host immune response*

Sumber: Hendry *et al.*, 2017

Mekanisme patogenik primer kanker payudara mencakup alterasi genetik, perubahan homeostasis hormonal, dan interferensi imun (Xiong *et al.*, 2025), yang ditunjukkan sebagai berikut.

a. Alterasi genetik

Alterasi/mutasi genetik merupakan dasar utama proses karsinogenesis. Karsinogenesis kanker payudara melibatkan serangkaian alterasi genetik dan perubahan homeostasis hormonal yang kompleks, yang pada akhirnya membentuk karakteristik molekuler tumor dan memengaruhi respons imun (Liu *et al.*, 2022; Bakhoum *et al.*, 2018). Menurut (Bailey *et al.*, 2021; Cho *et al.*, 2024), dalam proses evolusi tumor, berbagai perubahan genetik yang mendukung kelangsungan hidup sel kanker, antara lain:

1. Delesi DNA pada *tumor suppressor gene* yang menghilangkan kontrol pertumbuhan sel.
2. Represi transkrip, yaitu penekanan ekspresi gen penting seperti gen pengatur apoptosis atau respons imun.
3. Pembungkaman epigenetik (*epigenetic silencing*) melalui modifikasi DNA, sehingga gen penekan tumor tidak aktif.
4. Penggandaan genom total (*whole genome doubling*) yang memberikan peluang munculnya variasi baru dan evolusi sel kanker.

Melalui serangkaian gangguan genomik yang kompleks ini, memungkinkan sel-sel tumor bertahan dari tekanan lingkungan, menghindari pengawasan imun, dan berevolusi menjadi lebih agresif melalui proses seleksi yang menghilangkan variasi genetik yang merusak (*purifying selection*) (López *et al.*, 2020).

b. Perubahan homeostasis hormonal

Paparan hormon estrogen berlebihan, seperti terapi hormon menopause, asupan estrogen dari makanan, dan ketidakstabilan endokrin akibat faktor lain, merupakan faktor utama yang berkontribusi terhadap keganasan payudara sporadis.

Ketidakseimbangan antara estrogen dan progesteron dapat meningkatkan proliferasi sel dan memicu akumulasi kerusakan DNA. Singkatnya, gangguan homeostasis estrogen yang berlebihan pada jaringan payudara dapat mendorong perkembangan dan metastasis kanker payudara (Pedroza *et al.*, 2021; Xiong *et al.*, 2025).

c. Interferensi imun

Kanker payudara berkembang dalam TME yang terdiri dari sel tumor, matriks ekstraseluler, fibroblas, dan berbagai sel imun yang memengaruhi pertumbuhan tumor (Gómez *et al.*, 2020).

Pada tahap awal perkembangan tumor, TME umumnya menekan proliferasi tumor melalui sitokin yang diproduksi oleh sel T CD8+ dan CD4+ yang teraktivasi. Namun, seiring tumor menjadi lebih agresif, sel-sel tumor mulai mengekspresikan modulator *immune checkpoint* seperti *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) dan *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) untuk menekan respons imun terhadap tumor (Sammut *et al.*, 2024).

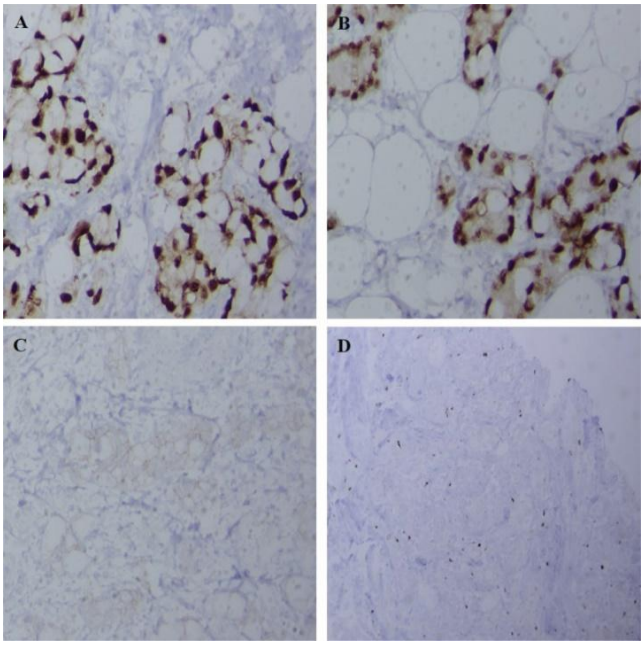
Selain itu, kanker payudara memiliki mekanisme unik dalam menghindari deteksi imun. Evolusi genomik meningkatkan heterogenitas tumor, menyebabkan variasi respons imun dan resistensi terhadap terapi (Onkar *et al.*, 2023). Secara spesifik, sel kanker payudara dapat meniru mekanisme antiinflamasi sistem saraf pusat untuk menghindari imunitas antitumor melalui sinaps imunologis (Li *et al.*, 2024). Interaksi kompleks antara sel tumor dan sistem imun dalam TME ini, termasuk mekanisme penghindaran imun, sangat memengaruhi komposisi dan fungsi sel-sel imun yang menginfiltrasi tumor, yang dikenal sebagai *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs).

2.1.5 Klasifikasi Subtipe Molekuler Kanker Payudara

Berdasarkan profil ekspresi gen, kanker payudara dikelompokkan menjadi tiga kelompok utama, yaitu luminal (A dan B), HER2+, dan *triple negative breast cancer* (TNBC) (Tan *et al.*, 2020). Klasifikasi subtipe molekuler ini memiliki korelasi yang baik dengan ekspresi reseptor estrogen (ER), progesteron (PR), dan HER2 yang mudah dinilai dengan uji klinis standar (Kumar *et al.*, 2021).

a. Luminal A

merupakan jenis kanker payudara yang paling umum, ditandai dengan ekspresi reseptor estrogen (ER) dan/atau progesteron (PR) positif, HER2 negatif, serta tingkat proliferasi sel yang rendah (Ki-67 <20%) (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022).

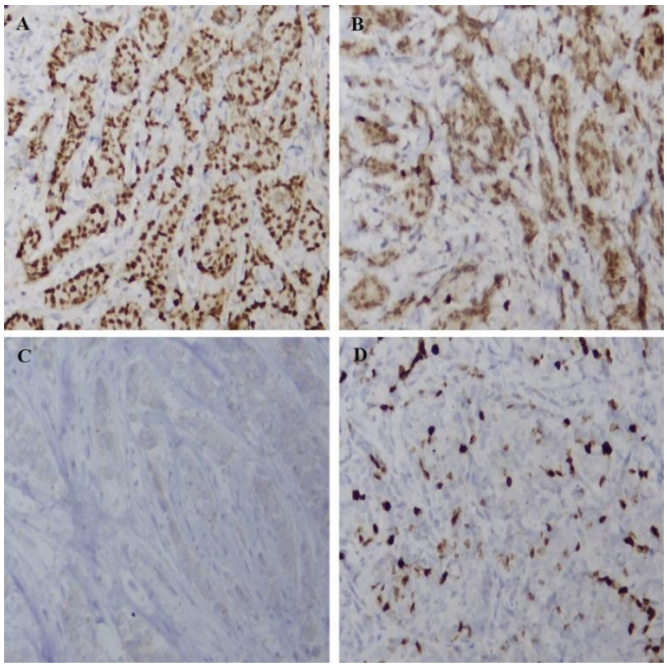


Gambar 2. 3. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif luminal A. *A,* ER positif. *B,* PR positif. *C,* HER2 1+ negatif. *D,* Ki-67 3%
Sumber: (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022)

b. Luminal B

Subtipe Luminal B memiliki ekspresi ER positif tetapi PR dapat negatif, dan HER2 dapat positif atau negatif. Tumor ini menunjukkan tingkat proliferasi sel yang lebih tinggi dibanding

subtipe Luminal A, yang ditandai dengan ekspresi Ki-67 >20% (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). Karakteristik biologisnya lebih agresif dibanding Luminal A, dengan beban aberasi genomik yang lebih besar serta sering disertai mutasi *tumor suppressor gene*, termasuk mutasi TP53 atau mutasi germline BRCA2 (*Breast Cancer gene 2*) yang dikaitkan dengan subtipe Luminal B (Kumar *et al.*, 2021).



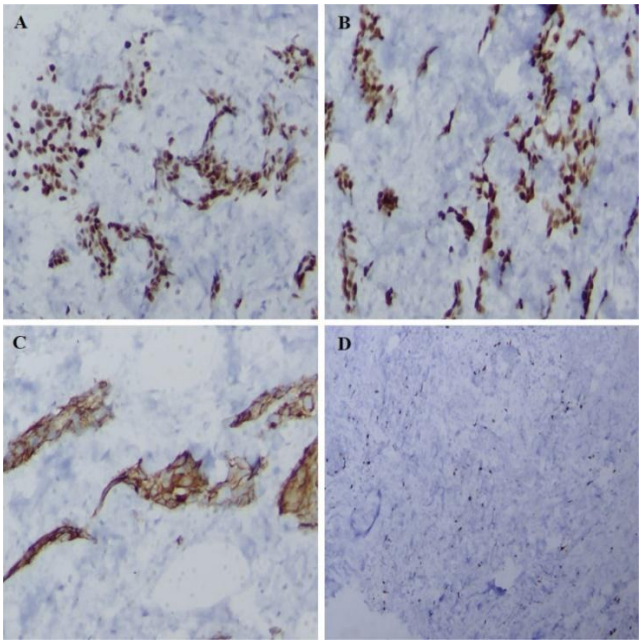
Gambar 2. 4. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif luminal B. *A,* ER positif. *B,* PR positif. *C,* HER2 1+ negatif. *D,* Ki-67 30%
Sumber: (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022)

c. HER2+

Subtipe HER2+ (*human epidermal growth factor receptor 2*) ditandai oleh amplifikasi gen HER2 (juga dikenal sebagai *ERBB2*) pada kromosom 17q, yang menyebabkan overekspresi protein HER2. HER2 merupakan *receptor tyrosine kinase* yang mendorong proliferasi sel dan menghambat apoptosis melalui aktivasi jalur sinyal RAS dan PI3K-AKT (Bergamino *et al.*, 2022).

Subtipe ini mencakup 10–15% kanker payudara dan ditandai dengan ekspresi HER2+ yang tinggi. Dalam hal ini, dua

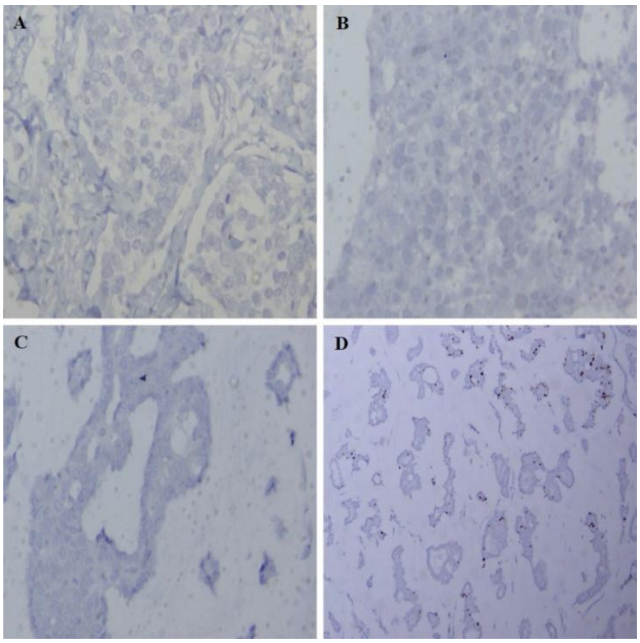
subkelompok dapat dibedakan: HER2 luminal (E+, PR+, HER2+, dan Ki-67:15–30%) dan HER2-*enriched* (E-, PR-, HER2+, Ki-67>30%) (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022).



Gambar 2. 5. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif HER2+
A, ER positif. *B,* PR positif. *C,* HER2 3+ positif. *D,* Ki-67 5%
Sumber: (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022)

d. TNBC

Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) merupakan subtipe kanker payudara dengan ekspresi ER-negatif, PR-negatif, dan HER2-negatif. Subtipe ini mencakup sekitar 10% dari seluruh kasus kanker payudara dan lebih sering terjadi pada wanita berusia di bawah 40 (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). TNBC dikenal karena sifatnya yang agresif dan heterogenitas molekuler yang tinggi (Kumar *et al.*, 2021; Mitri *et al.*, 2022).



Gambar 2. 6. Imunohistokimia karsinoma payudara invasif TNBC. *A,* ER negatif. *B,* PR negatif. *C,* HER2 0+ negatif. *D,* Ki-67 positif 10%
Sumber: (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022)

2.1.6 Prognosis dan Penatalaksanaan Berdasarkan Subtipe

a. Luminal A

Subtipe Luminal A memiliki prognosis terbaik di antara semua subtipe kanker payudara, ditandai dengan insiden relaps yang rendah dan tingkat overall survival (OS) yang tinggi. Hal ini disebabkan oleh karakteristik biologisnya yang bergradasi rendah, fraksi pertumbuhan sel yang minimal, dan ekspresi gen proliferatif yang rendah (Ki-67 <20%) (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2021).

Penatalaksanaan utama untuk Luminal A adalah terapi endokrin (anti-estrogen) seperti tamoxifen atau aromatase inhibitors, yang menunjukkan respons sangat baik. Sedangkan manfaat kemoterapi pada subtipe ini relatif terbatas (Yu *et al.*, 2019). Prognosis yang baik pada subtipe ini sebagian besar dikaitkan dengan regulasi hormon yang relatif stabil dan aktivitas proliferasi yang rendah (Kumar *et al.*, 2021).

b. Luminal B

Tumor luminal B memiliki tingkat yang lebih tinggi dan prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan Luminal A. Ki-67 yang tinggi (>20%) membuatnya tumbuh lebih cepat daripada luminal A (Mohammed, 2021), serta derajat histologis menengah hingga tinggi. Tumor ini dapat memperoleh manfaat dari terapi hormonal bersama dengan kemoterapi (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). Subtipe ini menunjukkan respons terhadap terapi hormon, namun manfaat kemoterapi lebih besar dibandingkan Luminal A karena aktivitas proliferasi yang tinggi (Lafci *et al.*, 2023).

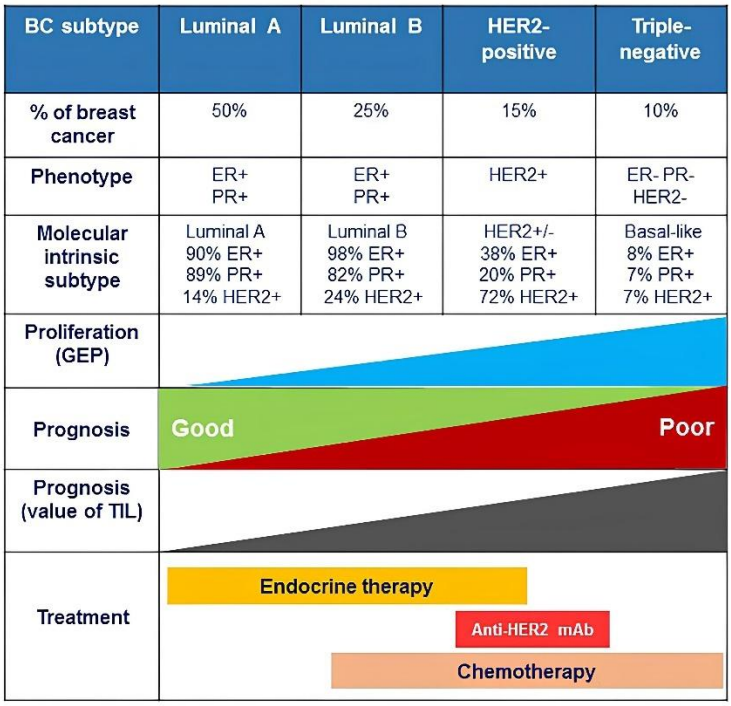
c. HER2+

Secara klinis, subtipe HER2+ dikenal lebih agresif dan berproliferasi cepat dibandingkan subtipe luminal. Namun prognosisnya telah membaik secara signifikan sejak diperkenalkannya terapi yang menargetkan HER2 (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). Penatalaksanaan utama untuk subtipe ini adalah terapi anti-HER2, seperti trastuzumab, yang menunjukkan respons sangat baik. Selain itu, tumor HER2+ juga memiliki tingkat respons yang tinggi terhadap kemoterapi. Terapi endokrin hanya memberikan manfaat terbatas pada subtipe ini (Swain *et al.*, 2023; Wang & Xu, 2019).

d. TNBC

TNBC) memiliki prognosis yang secara umum lebih buruk dibandingkan subtipe kanker payudara lainnya. Hal ini disebabkan oleh sifatnya yang sangat agresif, tingkat proliferasi sel yang tinggi, diferensiasi histologis yang buruk, serta ketidakstabilan genom yang signifikan. Sekitar 80% kasus TNBC juga terkait dengan mutasi atau inaktivasi gen penekan tumor BRCA1 atau BRCA2, yang berkontribusi pada karakteristik agresifnya (Loibl & Gianni, 2017).

Karena ketiadaan ekspresi reseptor hormon (ER, PR) dan HER2, TNBC tidak merespons terapi endokrin atau terapi target HER2. Oleh karena itu, kemoterapi menjadi modalitas penatalaksanaan utama untuk subtipe ini (Kumar *et al.,* 2021).



Gambar 2. 7. Gambaran klasifikasi, prognosis, dan terapi tiap subtipe molekuler kanker payudara
Sumber: Ben-Jonathan *et al.*, 2022

2.2 *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs)

2.2.1 Definisi

Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) didefinisikan sebagai kumpulan sel mononuklear, termasuk limfosit dan sel plasma, yang terdapat di dalam jaringan tumor dan diidentifikasi melalui kriteria morfologi klasik (Valenza *et al.*, 2023). Keberadaan TILs merefleksikan respons imun host terhadap tumor yang sedang berlangsung dalam *tumor microenvironment* (TME) (Ciarka *et al.*, 2024).

2.2.2 Komponen Seluler TILs

Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) terdiri dari berbagai populasi sel imun mononuklear yang diklasifikasikan berdasarkan fenotipe dan fungsi biologisnya (Paijens *et al.*, 2021). Komponen utama TILs meliputi:

a. Sel T sitotoksik (CD8+): Termasuk sel T *tissue-resident memory* (TRM) CD8+
b. Sel T helper (CD4+): Seperti sel Th1, Th2, dan Th17
c. Sel T regulator CD4+ (Treg): Ditandai oleh ekspresi *Forkhead Box* P3 (FOXP3)
d. Sel *Follicular Helper T cells* (Tfh) CD4+
e. Sel B: Limfosit B yang menyusup tumor

Pada kanker payudara, populasi TILs yang dominan meliputi sel T CD8+, CD4+, FOXP3+, dan sel B CD19+. Sementara itu, sel *Natural Killer* (NK) CD56+, makrofag, dan sel dendritik lebih jarang diamati dalam infiltrat TILs (Ciarka *et al.*, 2024).

2.2.3 Mekanisme Infiltrasi TILs dalam Tumor

Infiltrasi TILs ke dalam jaringan tumor merupakan proses kompleks yang melibatkan serangkaian interaksi imunologis antara sel tumor dan *tumor microenvironment* (TME) (Obeagu & Obeagu, 2024). Mekanisme ini dapat dijelaskan melalui beberapa tahapan:

a. Kemotaksis

Proses diawali dengan sekresi kemokin oleh sel-sel tumor, seperti CCL5, CXCL9, dan CXCL10. Kemokin ini berfungsi sebagai sinyal penarik yang merekrut limfosit T dari sirkulasi perifer. Limfosit T merespons sinyal ini melalui reseptor kemokin spesifik, seperti CCR5 dan CXCR3, yang terdapat di permukaannya (Wu *et al.*, 2024; Tang *et al.*, 2024).

b. Adhesi dan Transmigrasi

Setelah tertarik oleh kemokin, limfosit akan berikatan dengan sel endotel pembuluh darah di sekitar tumor melalui molekul adhesi seperti *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) dan *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1). Ikatan ini memungkinkan limfosit untuk melakukan transmigrasi, yaitu bergerak menembus dinding pembuluh darah dan masuk ke dalam jaringan tumor (Singh *et al.*, 2023)

c. Tantangan dalam TME

Setelah berada di dalam TME, aktivitas TILs dapat menghadapi berbagai hambatan. Lingkungan TME seringkali ditandai oleh matriks ekstraseluler yang padat, kondisi hipoksia, dan keberadaan sinyal imunosupresif seperti *Transforming Growth Factor-beta* (TGF-β) dan Interleukin-10 (IL-10). Faktor-faktor ini dapat menurunkan efektivitas sel T sitotoksik (CD8+) dalam menyerang sel tumor (Sarkar *et al.*, 2021)

d. Fungsi Efektor

Meskipun ada hambatan, pada kondisi imunogenik yang kuat, limfosit T CD8+ tetap mampu mengenali antigen tumor yang dipresentasikan oleh molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas I pada permukaan sel tumor. Setelah pengenalan, sel T CD8+ akan menjalankan fungsi sitotoksiknya untuk melisis sel tumor (Yao *et al.*, 2024).

2.2.4 TILs dalam Kanker Payudara

Pada kanker payudara, TILs memiliki peran krusial sebagai komponen respons imun host terhadap tumor. Kepadatan dan komposisi seluler TILs secara signifikan memengaruhi respons pasien terhadap terapi dan luaran klinis (Khoury *et al.*, 2018).

Infiltrasi TILs yang tinggi, khususnya limfosit T sitotoksik (CD8+), sering dikaitkan dengan respons yang menguntungkan terhadap pengobatan, termasuk peningkatan *pathologic Complete Response* (pCR) setelah kemoterapi neoadjuvan (Shou *et al.*, 2016). Sebaliknya, peningkatan populasi sel T regulator yang mengekspresikan FOXP3 dapat berkorelasi dengan prognosis yang kurang baik, karena sel-sel ini cenderung menekan respons imun antitumor, memungkinkan sel kanker untuk bertahan dan berkembang (Sobral-Leite *et al.*, 2019).

Aktivitas TILs juga sangat dipengaruhi oleh jalur *immune checkpoint*, seperti ekspresi *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) pada sel tumor. Interaksi ini dapat menghambat fungsi efektor limfosit dan memfasilitasi penghindaran imun oleh tumor, sehingga kepadatan TILs juga menjadi indikator potensial dalam imunoterapi (Zhang *et al.,* 2021). Penting untuk dicatat bahwa tingkat dan komposisi TILs dapat beradaptasi atau berubah sebagai respons terhadap pengobatan sebelumnya, misalnya kemoterapi neoadjuvan dapat memengaruhi populasi FOXP3+ pada penyakit residual (Hamy *et al.*, 2017; Asano *et al.*, 2016).

Selain itu, pada pasien kanker payudara dengan infiltrat limfosit yang ekstensif, TILs dapat bermanifestasi sebagai *tertiary lymphoid structures* (TLSs). Kehadiran TLSs ini telah dikaitkan dengan respons yang lebih baik terhadap kemoterapi adjuvan dan peningkatan *disease-free survival* (DFS) (Ciarka *et al.*, 2024).

2.2.5 Korelasi TILs dengan Subtipe Molekuler Kanker Payudara

Kepadatan TILs bervariasi secara signifikan di antara subtipe molekuler kanker payudara, yang mencerminkan perbedaan dalam imunogenisitas tumor dan respons imun host.

a. Luminal (Luminal A dan Luminal B)

Kanker payudara subtipe luminal, yang merupakan kelompok paling umum, umumnya ditandai dengan kadar TILs yang

rendah, biasanya kurang dari 10% (Solinas *et al.*, 2017). Meskipun Luminal B cenderung memiliki kadar TILs sedikit lebih tinggi dibandingkan Luminal A, signifikansi prognostiknya pada subtipe luminal masih menjadi perdebatan dan seringkali tidak konsisten. Beberapa studi melaporkan TILs sebagai indikator prognosis buruk, sementara yang lain tidak menemukan hubungan yang signifikan (Viale *et al.*, 2019; Dieci *et al.*, 2015; Montagna *et al.*, 2017; Criscitiello *et al.*, 2020; El Bairi *et al.*, 2021). Oleh karena itu, peran TILs sebagai stratifier prognostik yang pasti pada kanker payudara luminal masih kontroversial (El Bairi *et al.*, 2021; Amgad *et al.*, 2020).

b. HER2+

Subtipe HER2+ juga menunjukkan tingkat TILs yang lebih tinggi dibandingkan dengan subtipe luminal. Infiltrasi TILs yang tinggi pada HER2+ dapat meningkatkan respons terhadap terapi target HER2, seperti trastuzumab, meskipun korelasinya dengan *pathologic Complete Response* (pCR) setelah kemoterapi neoadjuvan tidak selalu langsung (Ciarka *et al.*, 2024; Schlam *et al.*, 2025).

c. TNBC

TNBC secara konsisten menunjukkan kadar TILs tertinggi, seringkali berkisar antara 15–25%. Tingginya infiltrasi TILs pada TNBC dikaitkan dengan beban mutasi tumor (*Tumor Mutational Burden*/TMB) tinggi, yang mendukung sifat imunogeniknya (Bianchini *et al.*, 2021). Kepadatan TILs yang tinggi pada TNBC berkorelasi dengan prognosis yang lebih baik dan respons yang lebih tinggi terhadap kemoterapi, serta menjadi indikator penting untuk respons terhadap imunoterapi (Sun *et al.*, 2021).

Secara keseluruhan, nilai prognostik dan prediktif TILs paling kuat terbukti pada subtipe TNBC dan HER2+, yang menunjukkan respons imun yang lebih aktif (Sun *et al.*, 2021). Meskipun demikian, penelitian mengenai TILs pada subtipe luminal, yang merupakan kelompok kanker payudara paling umum, tetap krusial. Hal ini dikarenakan heterogenitas klinis yang signifikan pada subtipe ini dan potensi *ImageJ* untuk mengungkap korelasi yang mungkin terlewatkan oleh penilaian manual yang rentan bias, sehingga dapat memberikan wawasan baru untuk stratifikasi risiko dan pengembangan terapi yang lebih personalisasi.

2.2.6 TILs sebagai Biomarker Prognostik dan Prediktif

Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) telah diakui sebagai biomarker imunologi penting dalam kanker payudara dan merefleksikan respons imun antitumor host yang sedang berlangsung (El Bairi *et al.*, 2021). Peran TILs dapat dikategorikan sebagai prognostik dan prediktif:

a. Biomarker Prognostik

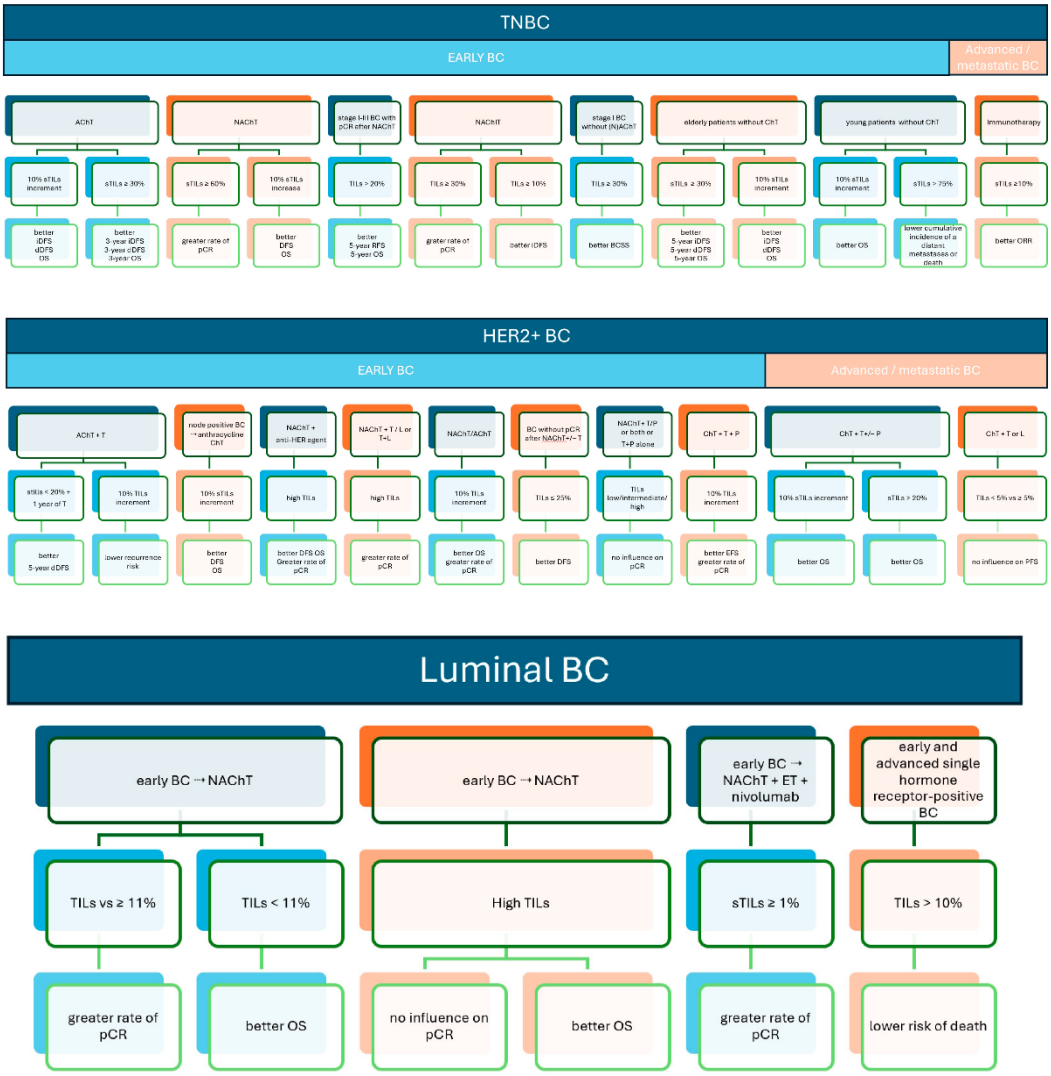
Sebagai biomarker prognostik, TILs memberikan informasi mengenai kemungkinan luaran penyakit pasien, terlepas dari jenis terapi yang diberikan. Infiltrasi TILs yang tinggi, terutama pada subtipe TNBC dan HER2+, secara konsisten dikaitkan dengan *overall survival* (OS) dan *disease-free survival* (DFS) yang lebih baik (Pujani *et al.*, 2020; Ciarka *et al.*, 2024). Berdasarkan tingkat infiltrasi TILs, tumor payudara dapat dikelompokkan menjadi *immune-high*, *immune-moderate*, dan *immune-low*. Subtipe TNBC dan HER2+ umumnya termasuk dalam kategori *immune-high*, menunjukkan respons imun yang lebih aktif, sedangkan tumor reseptor hormon positif (luminal) lebih sering tergolong

immune-moderate atau *immune-low* (Nagarajan & McArdle, 2018).

b. Biomarker Prediktif

Sebagai biomarker prediktif, *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) berperan dalam memprediksi respons pasien terhadap terapi tertentu. Kepadatan stromal TILs (sTILs) yang tinggi telah terbukti berkorelasi dengan respons yang lebih baik terhadap kemoterapi neoadjuvan, khususnya pada subtipe TNBC dan HER2+ (Pujani *et al.*, 2020; Denkert *et al.*, 2018; Ciarka *et al.*, 2024). *International Immuno-Oncology Working Group* (ITILWG) merekomendasikan evaluasi berbasis sTIL karena reproduksibilitas dan relevansi klinisnya, dan pelaporan rutin sTIL telah disetujui pada Konferensi Kanker Payudara Internasional *St. Gallen* ke-16 (Burstein *et al.*, 2019). Selain itu, keberadaan TILs yang signifikan mencerminkan respons imun *antitumor host* dan berpotensi menjadi indikator respons terhadap imunoterapi (Debien *et al.*, 2023; Denkert *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2020).

Meskipun demikian, perlu dicatat bahwa peran spesifik dan signifikansi klinis dari setiap subpopulasi TILs masih terus diteliti untuk pemahaman yang lebih mendalam (El Bairi *et al.*, 2021; Lam & Verrill, 2023). Berikut kumpulan studi pada artikel review oleh Ciarka *et al.*, 2024:



Gambar 2. 8. TILs sebagai biomarker: grafik prognosis dan hasil klinis
Sumber: Ciarka *et al.*, 2024

2.2.7 Standar Penilaian TILs dalam Praktik Klinis

Evaluasi TILs pada kanker payudara secara standar dilakukan menggunakan preparat histopatologi yang diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin (H&E). Metode ini direkomendasikan oleh ITILWG karena kemudahan akses, biaya yang relatif rendah, dan konsistensinya yang baik dalam visualisasi seluler (Pujani *et al.*, 2020).

a. Fokus Penilaian TILs

Sesuai pedoman *International TILs Working Group* (ITILWG) yang dikeluarkan pada tahun 2014, penilaian TILs difokuskan pada stromal TILs (sTIL), yaitu limfosit yang menginfiltrasi area stroma di dalam tumor invasif. Fokus pada sTIL ini didasarkan pada reproduksibilitasnya yang lebih tinggi dan relevansi klinisnya dibandingkan dengan intratumoral TILs (iTIL), yang cenderung lebih sedikit dan sulit diamati pada preparat H&E (Pujani *et al.*, 2020).

b. Prosedur Kuantifikasi

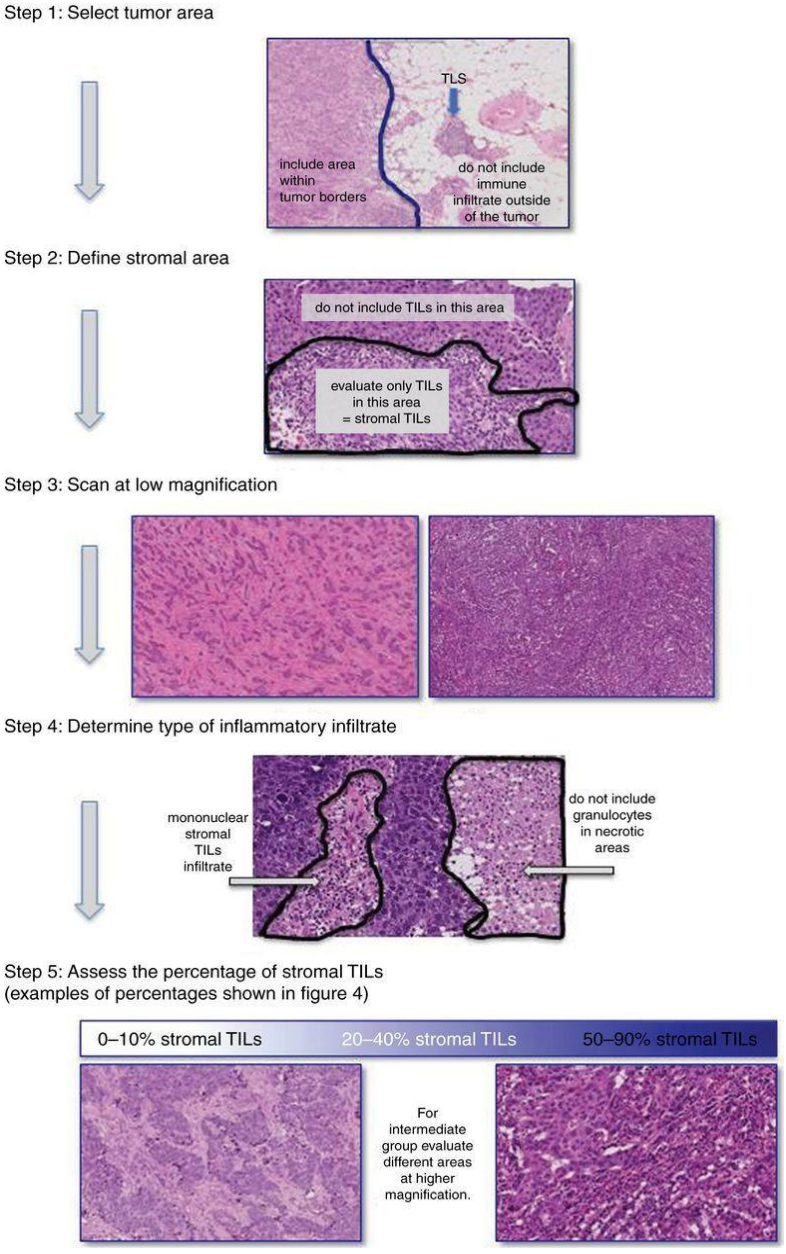
Penilaian sTIL dilakukan dengan mengestimasi persentase area stroma tumor invasif yang ditempati oleh sel limfosit mononuklear (terutama limfosit T dan B, serta sel plasma). Hasil dinyatakan dalam persentase (%sTIL), bukan jumlah sel absolut (Khan *et al.*, 2024; Okcu *et al.*, 2022). Evaluasi harus mencakup seluruh area invasif tumor, bukan hanya area dengan kepadatan tinggi (*hot spots*), untuk menghindari overestimasi (Salgado *et al.*, 2015).

c. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

International Immuno-Oncology Working Group (ITILWG) menetapkan kriteria ketat untuk area dan jenis sel yang dinilai (Dieci *et al.*, 2018), yaitu:

1. Area Inklusi: Hanya area stroma di dalam batas tumor invasif yang dievaluasi.
2. Area Eksklusi: TILs di luar batas tumor, di sekitar *ductal carcinoma in situ* (DCIS), lobulus normal, atau area dengan artefak (nekrosis, hialinisasi regresif, bekas biopsi inti) harus dikecualikan.

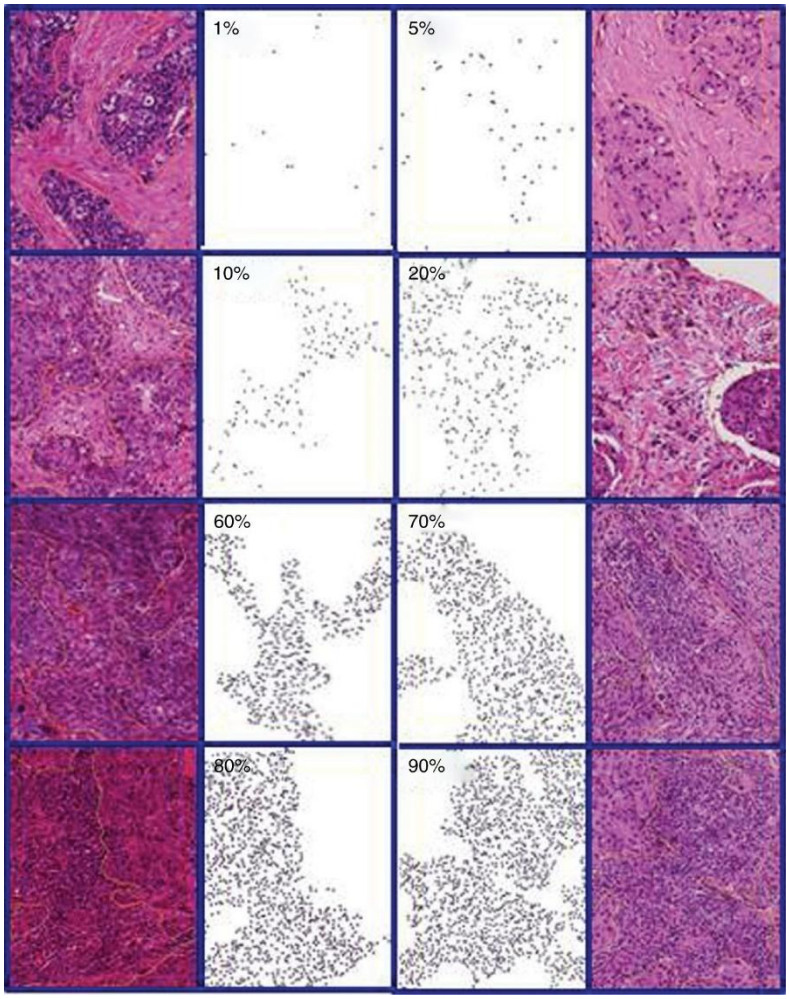
3. Jenis Sel: Seluruh sel mononuklear (limfosit dan sel plasma) dihitung, sedangkan leukosit polimorfonuklear dikecualikan.
4. Pembesaran: Evaluasi dilakukan pada slide setebal 4–5 µm dengan pembesaran mikroskop ×200–400. Potongan jaringan utuh lebih disarankan daripada biopsi inti jika memungkinkan (Salgado *et al.*, 2015).



Gambar 2. 9. Pendekatan standar evaluasi TILs pada tumor solid
Sumber: Salgado *et al.*, 2015

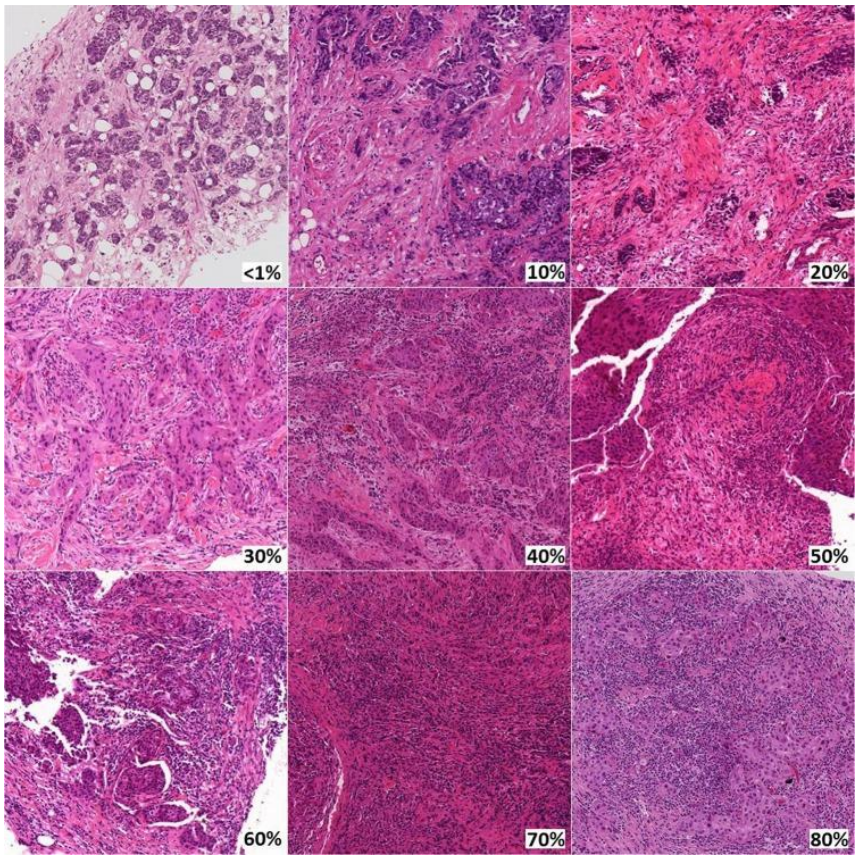
d. Kategorisasi Persentase sTIL

Persentase TILs stroma terbagi menjadi tiga kelompok berbeda dapat diidentifikasi: TILs rendah (0–10% sel imun dalam jaringan stroma di dalam tumor), TILs menengah (11–40%), dan TILs tinggi (>40%) (Salgado *et al.*, 2015).



Gambar 2. 10. Standardisasi dan pedoman untuk penilaian TILs
Sumber: Salgado *et al.*, 2015

Dalam upaya untuk meningkatkan konsistensi dan reproduksibiltas penilaian, ITILWG baru-baru ini menyediakan gambar referensi dan slide digital serta panduan yang dapat diakses mengenai analisis infiltrat sel imun heterogen (Kos *et al.*, 2020).



Gambar 2. 11. Gambar referensi persentase skor sTIL
Sumber: Kos *et al.*, 2020

2.2.8 Studi Terkait TILs pada Kanker Payudara

Penelitian mengenai TILs dalam kanker payudara telah berkembang pesat, mengidentifikasi peran pentingnya sebagai biomarker prognostik dan prediktif. Berbagai studi telah menginvestigasi korelasi antara tingkat infiltrasi TILs dengan karakteristik molekuler tumor, respons terhadap terapi, dan hasil klinis pasien. Berikut adalah tinjauan beberapa studi terdahulu yang relevan:

a. **Denkert *et al.* (2018)**: Studi ini menganalisis data dari 3771 pasien kanker payudara yang menerima kemoterapi neoadjuvan untuk mengevaluasi nilai prognostik TILs. Ditemukan bahwa tingkat TILs yang tinggi secara signifikan berkorelasi dengan *overall survival* (OS) dan *disease-free survival* (DFS) yang lebih baik pada subtipe TNBC dan HER2+. Namun, korelasi ini tidak signifikan pada subtipe

luminal, menegaskan pentingnya respons imun *host* dalam perjalanan penyakit, yang berbeda pada tiap subtipe.

b. Loi *et al.* (2019): Penelitian ini merupakan analisis gabungan dari studi-studi yang menginvestigasi nilai prognostik *stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (sTILs) pada TNBC stadium awal. Dengan data dari 2.148 pasien, studi ini mengkonfirmasi bahwa sTILs memiliki peran prognostik independen yang kuat untuk *invasive disease-free survival* (iDFS), *distant disease-free survival* (D-DFS), dan *overall survival* (OS). Peningkatan sTILs berkorelasi dengan hasil klinis yang lebih baik, mendukung integrasi sTILs dalam model prognostik TNBC.

c. Pujani *et al.* (2020): Studi ini menganalisis TILs pada 101 kasus karsinoma payudara invasif, membedakan sTIL dan iTIL berdasarkan panduan ITILWG. Penelitian ini menemukan bahwa baik sTIL maupun iTIL menunjukkan korelasi signifikan dengan berbagai parameter, termasuk tingkat tumor, ukuran, subtipe molekuler, metastasis kelenjar getah bening, mitosis, dan metastasis jauh. Studi ini menekankan bahwa penilaian TILs, yang dapat dilakukan secara reproduktif dan ekonomis menggunakan sediaan H&E, berfungsi sebagai indikator kuat respons imun antitumor.

d. Ciarka *et al.* (2024): Tinjauan komprehensif ini membahas peran TILs sebagai biomarker prognostik dan prediktif pada berbagai subtipe kanker payudara. Pada TNBC dan HER2+, kadar TILs yang tinggi konsisten terkait dengan prognosis lebih baik, respons terapi lebih tinggi, serta peningkatan *disease-free survival* (DFS) dan *overall survival* (OS). Sementara pada luminal pengaruh TILs tidak konsisten dan dapat mencerminkan sifat tumor yang lebih agresif. Pada

DCIS, masih belum jelas dan memerlukan penelitian lebih lanjut. Studi ini menekankan pentingnya standarisasi metode penilaian TILs untuk digunakan dalam prognostik kanker dan mendukung keputusan terapi secara lebih tepat.

e. **Leon-Ferre *et al.* (2024):** Studi ini menganalisis secara retrospektif terhadap 1966 peserta dengan TNBC tahap awal yang diobati dengan terapi lokoregional tanpa kemoterapi adjuvan atau neoadjuvan. Kadar TILs yang lebih tinggi dalam jaringan kanker payudara dikaitkan dengan peningkatan *invasive disease-free survival* (iDFS), *recurrence-free survival* (RFS), *survival free of distant recurrence* (*distant* RFS, DRFS), dan *overall survival* (OS). Kesimpulannya, tingkat kelangsungan hidup meningkat 90% untuk pasien dengan kadar TILs 50% atau lebih, dibandingkan dengan 72% untuk pasien dengan kadar TILs kurang dari 30% pada tindak lanjut 5 tahun.

f. **de Jong *et al.,* (2022):** Studi ini menilai prognostik sTIL pada 441 pasien berusia di bawah 40 tahun kanker payudara TNBC nodus-negatif (N0) dengan ER/PR < 1%, yang telah menjalani perawatan lokoregional saja, termasuk operasi aksila dan tidak menerima terapi sistemik neoadjuvan. Didapatkan bahwa sTIL yang tinggi (≥ 75%) menghasilkan prognosis yang sangat baik dengan insidensi kumulatif metastasis jauh atau kematian selama 15 tahun hanya 2,1%, sedangkan sTIL yang rendah (< 30%) memiliki prognosis yang tidak baik dengan insidensi kumulatif metastasis jauh atau kematian selama 15 tahun sebesar 38,4%. Selain itu, setiap peningkatan 10% sTIL menurunkan risiko kematian sebesar 19%.

g. **Gao *et al* (2020):** Meta-analisis yang mengeksplorasi secara komprehensif sebanyak 33 studi yang melibatkan 18.170 pasien kanker payudara yang diambil dari *PubMed*, *Embase*, EBSCO, *ScienceDirect*, *Cochrane Database*, dan *Web of Science* (hingga Maret 2020). Meta-analisis menunjukkan bahwa kadar TILs tinggi berkorelasi dengan kelangsungan hidup yang baik dan memprediksi pCR pada pasien kanker payudara dengan subtipe TNBC dan HER2+. Sebaliknya, analisis gabungan mengonfirmasi bahwa kelompok TILs yang tinggi dari subtipe Luminal berkorelasi signifikan dengan OS yang tidak baik.

2.3 *ImageJ*

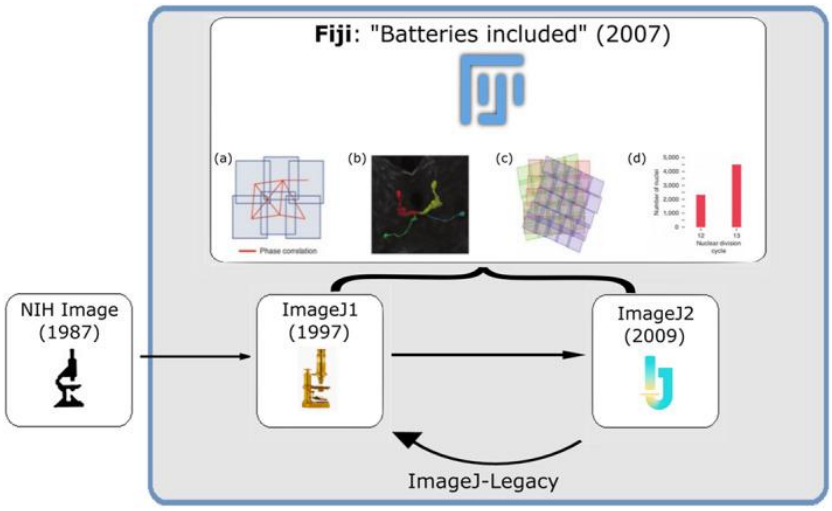
2.3.1 Definisi dan Sejarah *ImageJ*

ImageJ adalah perangkat lunak sumber terbuka (*open source software)* yang digunakan secara luas untuk memvisualisasikan, memeriksa, mengukur, dan memvalidasi data gambar ilmiah (Schroeder *et al.*, 2021).

Secara historis, cikal bakal *ImageJ* adalah *NIH Image*, sebuah perangkat lunak yang dikembangkan oleh Wayne Rasband pada tahun 1987 di *National Institutes of Health* (NIH). Seiring dengan dirilisnya bahasa pemrograman Java oleh *Sun Microsystems* pada tahun 1995, *NIH Image* mulai ditransisikan ke lingkungan Java, yang kemudian melahirkan platform baru bernama *ImageJ* (Schneider *et al.*, 2012). Sejak saat itu, *ImageJ* telah menjadi salah satu program paling populer untuk analisis citra ilmiah, terutama karena sifatnya yang sumber terbuka dan dapat diakses tanpa biaya finansial (Rueden *et al.*, 2017).

ImageJ dapat digunakan untuk melakukan berbagai tugas pemrosesan gambar standar, termasuk untuk gambar 8-bit, 16-bit, dan 32-bit, serta membaca dan menulis dalam berbagai format gambar, dan menghitung luas dan nilai piksel dari wilayah dan objek yang

ditentukan pengguna (Nieto-Olmedo *et al.*, 2020). Perangkat ini juga mendukung *plug-in* dan makro, serta memungkinkan analisis lanjutan (Rueden *et al.*, 2017).

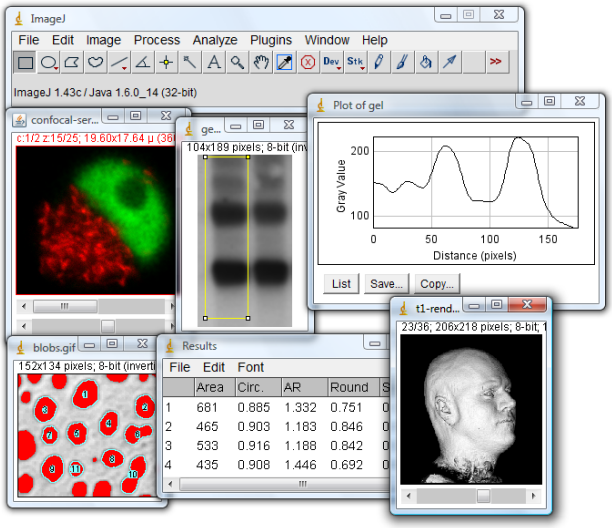


Gambar 2. 12. Diagram evolusi *ImageJ*
Sumber: Schroeder *et al.*, 2021

Ekosistem *ImageJ* saat ini mencakup *ImageJ* 1 (versi asli), *ImageJ* 2 (versi yang diperbarui), distribusi Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*), serta beragam plugin komunitas yang tersedia melalui *Update Sites* (Schindelin *et al.*, 2015). Seluruh komponen ini secara kolektif memperluas fungsionalitas *ImageJ* secara signifikan, yang menjadikannya alat yang fleksibel (Schroeder *et al.*, 2021).

2.3.2 Fitur dan Fungsi Utama

Penggunaan *ImageJ* berkisar dari visualisasi data dan pengajaran hingga pemrosesan gambar tingkat lanjut dan analisis statistik. Kemampuannya mencakup tugas-tugas umum seperti membuka gambar dalam berbagai format, memberi anotasi dan memproses gambar, serta menjalankan alur kerja sederhana pada gambar, hingga proyek yang melibatkan visualisasi dan analisis data gambar yang besar serta penerapan algoritma pembelajaran mesin (Schindelin *et al.*, 2015).



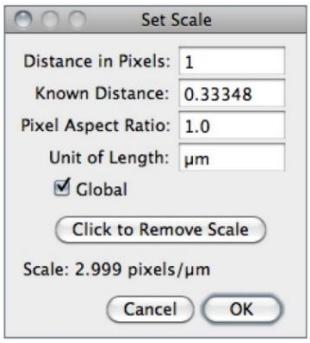
Gambar 2. 13. *Basic concepts of ImageJ*
Sumber: *ImageJ*

Dalam penelitian ini, akan digunakan fitur *thresholding* dan *analyze particle* pada *ImageJ*. Fitur ini memungkinkan peneliti untuk mengisolasi limfosit berdasarkan intensitas warna atau kepadatan piksel, serta menghitung jumlahnya secara akurat (Schroeder *et al.*, 2021). Penerapan fitur ini sangat berguna dalam penilaian TILs, khususnya untuk mengukur persentase limfosit dalam area stroma relatif terhadap total luas stroma tumor. Pendekatan ini menawarkan keuntungan signifikan dalam hal objektivitas, reproduksibilitas hasil, dan efisiensi waktu dibandingkan dengan metode penilaian manual yang mengandalkan pengamatan visual.

a. *Set scale*

Fitur *Set Scale* pada ImageJ digunakan untuk mengkalibrasi citra digital sehingga ukuran piksel dapat dikonversi ke satuan fisik, seperti mikrometer (µm). Kalibrasi ini diperlukan agar pengukuran luas, jarak, dan parameter lainnya memiliki nilai yang valid secara ilmiah. Pengaturan dilakukan melalui menu *Analyze* > *Set Scale* dengan memasukkan jarak piksel, jarak sebenarnya, dan satuan yang digunakan, serta dapat diterapkan secara global untuk seluruh citra. Kalibrasi yang tepat

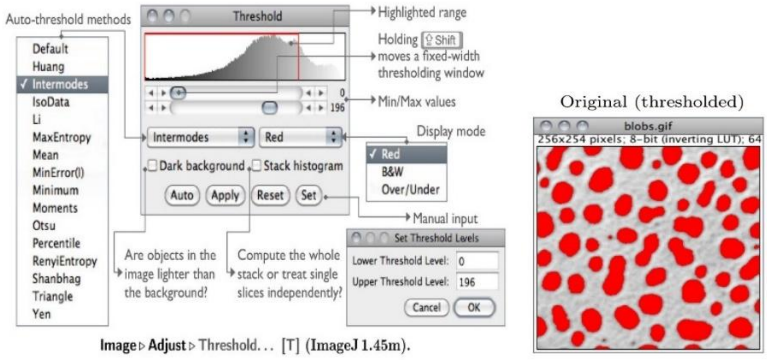
memungkinkan pengukuran area limfosit dan stroma tumor invasif secara akurat sesuai skala preparat histopatologi (Ferreira & Rasband, 2012).



Gambar 2. 14. Fitur *set scale*
Sumber: Ferreira & Rasband, 2012

b. *Threshold*

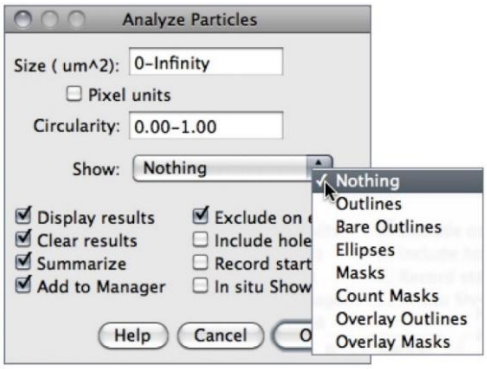
Fitur *Threshold* digunakan untuk melakukan segmentasi citra dengan memisahkan objek, seperti limfosit, dari latar belakang berdasarkan nilai intensitas piksel. Proses ini mengubah citra grayscale menjadi citra biner dengan menentukan ambang batas intensitas, yang dapat diatur secara manual atau menggunakan metode otomatis seperti *Otsu* melalui menu *Image* > *Adjust* > *Threshold*. Visualisasi *threshold* dapat ditampilkan dalam bentuk *overlay* warna untuk memudahkan identifikasi objek. *Thresholding* dapat diterapkan pada seluruh citra atau area seleksi (ROI) dan berperan penting dalam mengisolasi limfosit sebelum dilakukan analisis kuantitatif (Ferreira & Rasband, 2012).



Gambar 2. 15. Fitur *threshold*
Sumber: Ferreira & Rasband, 2012

c. *Analyze Particles*

Setelah proses segmentasi melalui thresholding, fitur *Analyze Particles* digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur objek pada gambar biner. Pengaturan ukuran dan sirkularitas partikel memungkinkan seleksi objek yang relevan, sehingga hanya limfosit yang dianalisis. Hasil pengukuran berupa jumlah objek dan luas area ditampilkan pada *Results Table*, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase sTILs dengan membandingkan luas area limfosit terhadap luas stroma tumor invasif (Ferreira & Rasband, 2012).

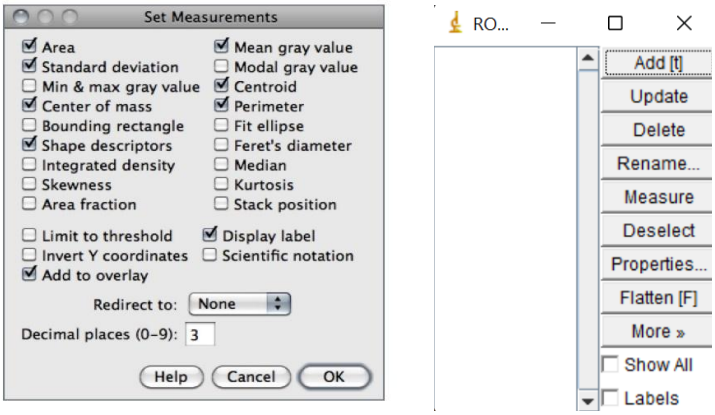


Gambar 2. 16. Fitur *analyze particles*
Sumber: Ferreira & Rasband, 2012

d. *Measurement*

Fitur *measurement* melakukan pengukuran pada area yang dipilih atau seluruh gambar jika tidak ada area yang dipilih. Untuk gambar

yang diberi *threshold*, pengukuran dibatasi hanya pada piksel yang disorot jika opsi *Limit to Threshold* diaktifkan. Fitur ini juga dapat diakses dengan klik kanan pada *Results Table* atau dengan menekan *Ctrl* + *T*, maka *ImageJ* akan menjalankan perintah *Analyze* > *Measure* yang akan menghitung parameter yang telah ditentukan, seperti luas area contohnya, dan menampilkan hasilnya di *Results Table*. Fitur ini mempercepat proses pengukuran berulang dan memudahkan pengumpulan data selama analisis citra (Ferreira & Rasband, 2012).



Gambar 2. 17. Fitur *measurement*
Sumber: Ferreira & Rasband, 2012

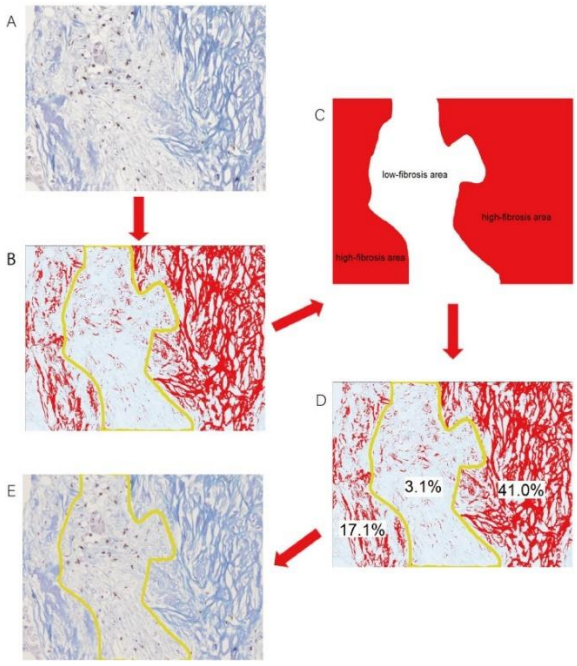
2.3.3 Penerapan dan Studi Terkait dalam Analisis Histopatologi

Metode visualisasi jaringan menghasilkan citra kompleks yang membutuhkan analisis mendalam. Algoritme otomatis diperlukan untuk mengenali, memisahkan, dan mengukur elemen seluler dengan efisien. Pengukuran manual memakan waktu dan membatasi analisis pada sebagian kecil populasi sel. Penggunaan perangkat lunak seperti *ImageJ* memungkinkan identifikasi dan kuantifikasi morfologi yang sulit diukur secara manual. (Šimunić *et al.*, 2024).

Dalam bidang histopatologi digital, *ImageJ* telah menjadi alat yang sangat penting dan banyak digunakan (Wang *et al.*, 2021; Chatzopoulos *et al.*, 2020). Berdasarkan kapabilitas tersebut, penelitian ini akan memanfaatkan *ImageJ* untuk menilai mengukur luas TILs, mengukur luas area stroma, dan menilai intensitas

pewarnaan pada jaringan tumor. Berikut beberapa studi terdahulu yang menunjukkan efektivitas analisis gambar digital *ImageJ* dalam menganalisis jaringagn histopatologi secara umum:

a. **Wang *et al.*, 2021:** Studi ini menilai hubungan infiltrasi TILs dan fibrosis intratumoral pada kanker kolorektal primer serta metastasis menggunakan imunohistokimia dan analisis *ImageJ*. Metastasis peritoneum memiliki infiltrasi TILs lebih rendah dan tingkat fibrosis lebih tinggi dibandingkan hati dan paru. Kepadatan TILs menurun pada area dengan fibrosis tinggi. Tumor dengan *Immunoscore* tinggi menunjukkan infiltrasi TILs lebih baik pada metastasis. Fibrosis tinggi dapat menghambat infiltrasi TILs dan memperburuk prognosis.



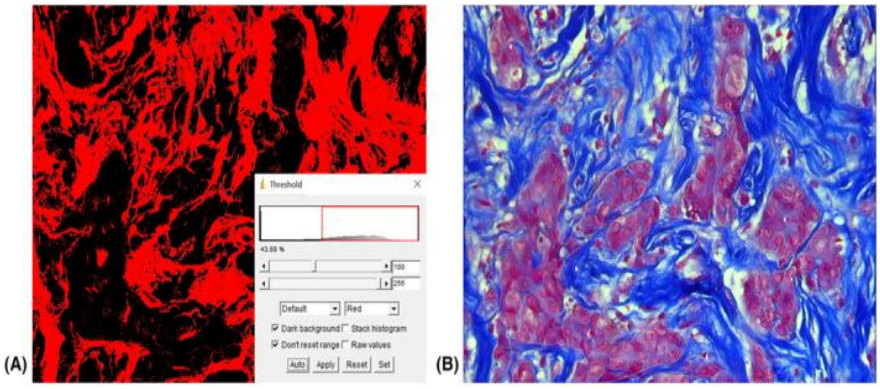
Gambar 2. 18. Evaluasi distribusi TIL di area fibrosis tinggi dan area fibrosis rendah
Sumber: Wang *et al.*, 2021

b. **Al Taher *et al.*, 2024:** Studi ini membandingkan penilaian manual dan semi-otomatis dengan *ImageJ* untuk mengevaluasi ekspresi PD-L1 pada jaringan imunohistokimia. Pada limfoma sel B besar difus, hasil *ImageJ* (RGB dan

Brightness/Contrast) sebanding dengan metode manual, tetapi HSB berbeda signifikan. Pada jaringan karsinoma sel skuamosa yang heterogen, perbedaan skor lebih sering muncul kecuali dengan *Brightness/Contrast*. Kesimpulannya, *ImageJ* cocok untuk jaringan homogen, sedangkan jaringan heterogen sebaiknya dinilai manual.

c. **Roxanis *et al.*, 2018:** Studi ini menilai fitur mikroarsitektur tumor payudara pada *tissue microarrays* (TMAs) di 696 sampel sebagai parameter prognostik, dan memanfaatkan *ImageJ* untuk mengkuantifikasi fitur-fitur yang tidak dapat diukur secara visual, seperti jumlah sarang tumor dan luas rata-rata sarang. Penggunaan *ImageJ* divalidasi dengan platform komersial (*Visiopharm*), dan hasilnya menunjukkan bahwa analisis digital ini mampu mengidentifikasi parameter prognostik yang signifikan terkait keterlibatan kelenjar getah bening dan kelangsungan hidup pasien.

d. **Lukianova *et al.*, 2024**: Studi ini menggunakan berfokus pada kuantifikasi *tumor-stroma ratio* (TSR) dan kepadatan kolagen pada jaringan kanker payudara menggunakan *ImageJ*. Dengan memanfaatkan fitur *thresholding* dan pengukuran area, *ImageJ* memungkinkan kuantifikasi luas stroma dan elemen tumor secara otomatis. Hasil studi ini menunjukkan korelasi antara parameter yang diukur dengan *ImageJ* dengan stadium dan subtipe molekuler kanker, menyoroti potensi *ImageJ* dalam menilai perubahan matriks ekstraseluler.



Gambar 2. 19. Pengukuran area stroma dan tumor dengan *ImageJ* untuk perhitungan TSR dan densitas *fiber*.
(A) Area stroma diukur dengan *Threshold*; (B) area tumor diukur dengan algoritma *ImageJ* klasik.
Sumber: Lukianova *et al.*, 2024

2.3.4 Keunggulan *ImageJ* Dibandingkan Penilaian Manual

Kuantifikasi TILs manual pada gambar slide utuh/*whole slide images* (WSIs) membutuhkan waktu lama, membutuhkan tenaga kerja besar, rentan terhadap bias dan ketidakakuratan subjektif (Loi *et al.*, 2019; Rakaee *et al.*, 2023; Shvetsov *et al.*, 2022). Oleh karena itu, diperlukan metode yang lebih objektif dan akurat. Salah satu upaya untuk mengatasi keterbatasan tersebut adalah dengan menggunakan perangkat lunak seperti *ImageJ*, yang mempunyai tujuan utama pemrosesan dan analisis gambar (Rueden *et al.*, 2017; Lukianova *et al.*, 2024).

Dengan demikian, penggunaan *ImageJ* memungkinkan peneliti memperoleh data yang lebih jelas mengenai hubungan TILs dengan subtipe molekuler kanker yang membantu untuk menilai potensi peran TILs dalam prediksi dan prognosis penyakit. Dengan demikian, *ImageJ* menjadi alat penting untuk analisis TILs secara kuantitatif dan sistematis.

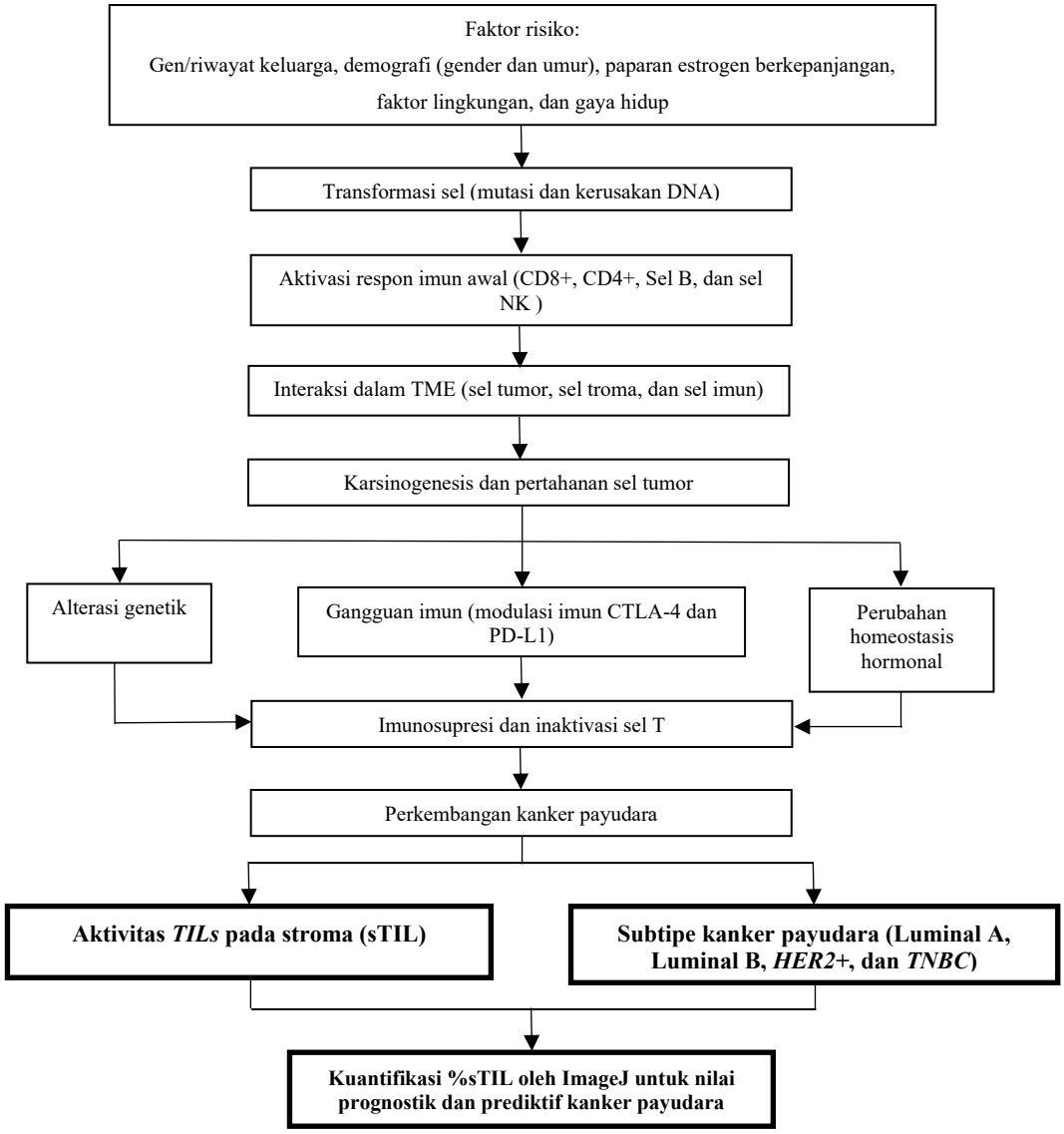
2.3.5 Tantangan dan Keterbatasan

Fleksibilitas *ImageJ* memang menjadi kelebihan, tetapi juga dapat menjadi tantangan bagi pengguna yang kurang berpengalaman dalam

analisis citra atau pemrograman. Untuk tugas-tugas yang lebih kompleks, seperti otomatisasi berskala besar atau pemrosesan citra 3D, seringkali diperlukan *plugin* tambahan atau integrasi dengan perangkat lunak tambahan (Rueden *et al.*, 2017). Selain itu, perlu diingat bahwa beberapa alur kerja dalam *ImageJ* masih melibatkan langkah-langkah manual, yang berpotensi menimbulkan variabilitas antar-pengamat jika tidak distandarisasi dengan baik (Schindelin *et al.*, 2015).

2.4 Kerangka Teori

Berdasarkan tinjauan pustaka di atas dan penelitian-penelitian yang telah ada sebelumnya, maka dapat disusun kerangka teori sebagai berikut.



Gambar 2. 20. Kerangka Teori
Sumber: (Xiong *et al*, 2025; Ciarka *et al.*, 2024)

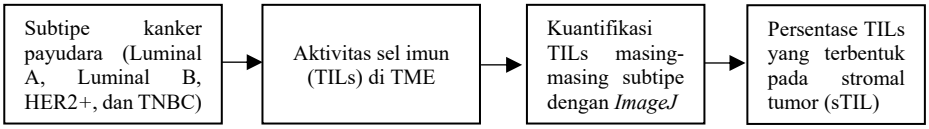
Keterangan:

Variabel yang diteliti

Variabel yang tidak diteliti

2.5 Kerangka Konsep

Kerangka konsep ini menggambarkan hubungan antara subtipe molekuler kanker payudara (variabel independen) dengan persentase TILs yang terbentuk (variabel dependen). Aktivitas TILs di TME dianalisis dan dikuantifikasi menggunakan *ImageJ*, untuk mengetahui jumlah TILs pada masing-masing subtipe molekuler. Berikut kerangka konsep yang digunakan dalam penelitian:



2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

Ho:

Tidak ada hubungan yang signifikan antara jumlah *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) yang dianalisis menggunakan *ImageJ* dengan subtipe molekuler kanker payudara.

Ha:

Terdapat hubungan yang signifikan antara jumlah *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) yang dianalisis menggunakan *ImageJ* dengan subtipe molekuler kanker payudara.

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional dengan pendekatan *cross-sectional*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara nilai *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) dengan subtipe molekuler kanker payudara pada preparat histopatologi menggunakan perangkat lunak *ImageJ* untuk kuantifikasi TILs.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober-November tahun 2025. Pengumpulan data dan analisis citra dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Daerah dr. H. Abdul Moeloek (RSUDAM) Bandar Lampung.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh pasien kanker payudara wanita yang telah didiagnosis secara histopatologis di RSUDAM selama periode Januari–Desember 2024.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah preparat H&E kanker payudara wanita yang sudah teridentifikasi imunohistokimia di RSUDAM. Sampel yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *stratified random*

sampling untuk memastikan representasi yang proporsional dari setiap subtipe molekuler kanker payudara.

Penentuan ukuran sampel dalam penelitian ini dilakukan untuk mengestimasi rata-rata TILs pada berbagai subtipe molekuler kanker payudara. Rumus penentuan ukuran sampel merujuk pada buku "*Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*" oleh Wayne W. Daniel dan Chad L. Cross Edisi ke-10 (Daniel & Cross, 2013), yang merupakan salah satu referensi dalam perhitungan ukuran sampel untuk penelitian kesehatan.

$$n = \frac{z^2\,\sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:
n = Jumlah sampel
z^2 = Nilai z pada *confidence interval* 95% (1,96)
σ^2 = Estimasi standar deviasi populasi
d^2 = *Margin of error* 10% dalam memperkirakan proporsi

Karena standar deviasi populasi tidak diketahui, maka digunakan nilai standar deviasi yang diambil dari data jurnal yang relevan, oleh Pujani, *et al.* 2020 "*Evaluation of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Breast Carcinoma and Their Correlation with Molecular Subtypes, Tumor Grade and Stage*" yang memuat standar deviasi dan *mean* pada sTIL terhadap subtipe molekuler kanker payudara.

Nilai standar deviasi dihitung sebagai nilai SD sTIL subtipe molekuler:
$\sigma = 28{,}61$

Margin of error ditetapkan sebesar 10% dari nilai *mean* sTIL subtipe molekuler, maka *mean* sTIL:

$Mean = 62{,}9$

Maka margin of error yang digunakan adalah:

$d = 10\% \times 62{,}9 = 6{,}29$

Kemudian memasukkan nilai σ^2 dan d ke rumus:

$$n = \frac{z^2\,\sigma^2}{d^2}$$

$$n = \frac{1{,}96^2 \times 28{,}61^2}{6{,}29^2}$$

$n = 79{,}5 \approx 80\ (dibulatkan)$

Dengan demikian, jumlah minimum subjek penelitian yang diperlukan untuk mencapai *confidence interval* 95% dengan *margin of error* 10% adalah 80 preparat pasien kanker payudara, yang kemudian akan dikelompokkan berdasarkan subtipe molekuler sesuai dengan persentase TILs-nya.

Untuk menjaga proporsionalitas dan representativitas, jumlah sampel tersebut kemudian didistribusikan berdasarkan proporsi masing-masing subtipe molekular pada data rekam medik Instalasi Patologi Anatomi RSUDAM tahun 2024. Berikut perhitungan proporsi tiap subtipe:

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

Keterangan:

p_i = proporsi subtipe ke-i

n_i = jumlah populasi subtipe ke-i

N = total populasi

Setelah mendapatkan proporsi tiap subtipe, dilanjutkan untuk mengalikan proporsi tersebut dengan total jumlah sampel yaitu 80, untuk mendapatkan jumlah sampel per subtipe:

$n_{subtipe} = p_i \times 80$

Maka, jumlah sampel per subtipe berdasarkan total sampel dan proporsi subtipe dari data rekam medik Instalasi Patologi Anatomi RSUDAM, yaitu:

Tabel 3. 1 Jumlah sampel tiap subtipe

Subtipe Molekuler	**Proporsi (%)**	**Jumlah sampel ($n = 80$)**
Luminal A	15%	12
Luminal B	62,5%	50
HER2+	11,25%	9
TNBC	11,25%	9

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas (*independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jumlah *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) yang dihitung dalam stroma tumor menggunakan *ImageJ* untuk melihat hubungannya dengan subtipe molekuler kanker payudara.

3.4.2 Variabel Terikat (*dependent variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah subtipe molekuler kanker payudara (Luminal A, Luminal B, HER2+, dan TNBC), yang ditentukan berdasarkan karakteristik molekuler tumor, yang dapat mempengaruhi prognosis dan pilihan pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati bagaimana keberadaan dan jumlah *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) berhubungan dengan perbedaan subtipe molekuler kanker payudara yang ditemukan dalam sampel.

3.5 Kriteria Sampel

3.5.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel:

1. Preparat hasil imunohistokimia sesuai dengan nomor rekam medik.
2. Preparat hasil imunohistokimia tersedia lengkap untuk penentuan subtipe molekuler.
3. Slide preparat H&E yang telah dianalisis secara imunohistokimia.

3.5.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel:

1. Preparat tidak dapat terbaca dengan jelas di bawah mikroskop.
2. Kasus dengan data imunohistokimia yang tidak lengkap.
3. Pasien dengan riwayat terapi imun sebelumnya.

3.6 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan teknik *stratified random sampling.*

3.7 Definisi Operasional

Tabel 3. 2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Satuan Ukur	Skala Ukur
Subtipe kanker payudara	Klasifikasi berdasarkan molekuler (Luminal A, Luminal B, HER2+, TNBC)	Hasil IHK (ER,PR, HER2, Ki-67)	-	Kategorik
TILs	Persentase limfosit dalam stroma tumor yang dihitung menggunakan *ImageJ*	*ImageJ*	%	Rasio

3.8 Instrumen, dan Bahan Penelitian

3.8.1 Instrumen Penelitian

Berikut ini merupakan instrumen yang digunakan dalam proses penelitian yang dapat dilihat pada:

1. Mikroskop cahaya
2. Komputer/laptop dengan *software ImageJ*

3. Form lembar observasi

3.8.2 Bahan Penelitian

Berikut ini merupakan bahan yang digunakan dalam proses penelitian yang dapat dilihat pada:

a. Preparat jaringan kanker payudara
b. Hasil imunohistokimia (ER, PR, HER2, dan Ki-67)
c. Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (H&E)

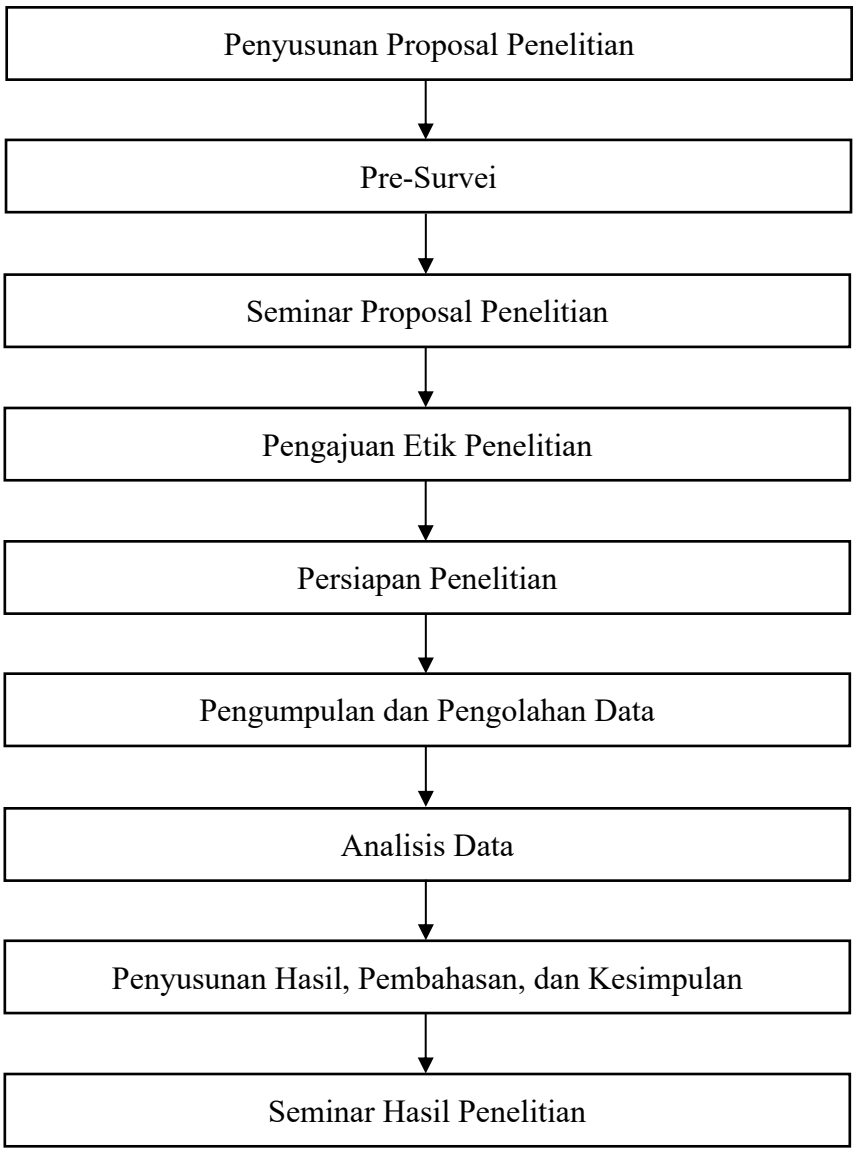
3.9 Prosedur dan Alur Penelitian

3.9.1 Prosedur Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menyusun proposal dan melakukan seminar proposal
2. Meminta surat pengantar dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk melakukan penelitian setelah proposal sudah disetujui oleh pembimbing
3. Mengajukan penelitian kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Rumah Sakit Umum Daerah dr. H. Abdul Moeloek (RSUDAM) Bandar Lampung untuk mendapatkan surat izin penelitian dan kelayakan etik
4. Melaksanakan pengambilan data penelitian sesuai dengan prosedur dan instrumen yang telah disusun
5. Melakukan seminar hasil penelitian untuk memaparkan hasil dari penelitian yang sudah dilakukan.

3.9.2 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.10 Manajemen Data

3.10.1 Sumber Data

3.10.1.1 Data Primer

Penelitian ini tidak menggunakan data primer.

3.10.1.2 Data Sekunder

Data berupa foto mikroskopis jaringan kanker payudara dari setiap subtipe, yang berasal dari hasil pemeriksaan

imunohistokimia dan diperoleh dari arsip Laboratorium Patologi Anatomi RSUDAM.

3.10.2 Analisis Data

3.10.2.1 Analisis *Univariat*

Digunakan untuk mendeskripsikan distribusi frekuensi karakteristik subjek penelitian, nilai *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs), dan subtipe molekuler kanker payudara.

3.10.2.2 Analisis Bivariat

Analisis ini menggunakan SPSS untuk mengetahui hubungan antara jumlah *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (TILs) dengan subtipe molekuler kanker payudara. Uji normalitas yang akan digunakan adalah *Shapiro-Wilk Test* pada subtipe Luminal A, HER2+, dan TNBC, sedangkan pada Luminal B dilakukan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov*. Data yang terdistribusi normal akan dianalisis dengan uji parametrik *One-Way ANOVA* untuk menguji perbedaan rata-rata antar kelompok. Jika data tidak terdistribusi normal, analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil analisis dianggap bermakna secara statistik jika nilai $p < 0,05$.

3.11 Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung dengan nomor surat kelayakan etik 615/KEPK-RSUDAM/X/2025. Pelaksanaan penelitian dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. H. Abdul Moeloek setelah mendapatkan izin penelitian dengan nomor 000.9.2/0967/VII.01/X/2025. Seluruh proses penelitian dan pengambilan data dilakukan langsung oleh peneliti dengan mematuhi ketentuan etik yang berlaku untuk menjaga dan memastikan hak, integritas, kerahasiaan, serta keamanan data penelitian

BAB V
SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Distribusi TILs berbeda pada setiap subtipe molekuler kanker payudara, dengan pola infiltrasi yang mencerminkan karakteristik biologis masing-masing kelompok. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok dengan urutan infiltrasi TILs dari rendah ke tinggi adalah luminal A, Luminal B, HER2+ dan TNBC.
2. Terdapat perbedaan bermakna nilai TILs antar empat subtipe molekuler kanker payudara. Analisis lanjutan menunjukkan Luminal A dan Luminal B tidak berbeda signifikan, namun keduanya memiliki nilai TILs yang jauh lebih rendah dibandingkan HER2+ dan TNBC.

5.2 Saran

5.2.1 Bagi Peneliti Selanjutnya

Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan sampel lebih besar dan distribusi subtipe yang lebih seimbang agar representatif. Variabel klinis dan patologis seperti *grade* histopatologi, stadium, ukuran tumor, dan status limfovaskular perlu ditambahkan untuk memperkaya analisis. Penggunaan metode penilaian yang lebih objektif seperti *digital pathology*, pemeriksa ganda, atau analisis berbasis kecerdasan buatan juga dianjurkan. Selain itu, penelitian lanjutan penting untuk mengevaluasi potensi TILs sebagai penanda prediktor respons terapi terutama pada subtipe HER2 positif dan TNBC.

5.2.2 Bagi Klinisi dan Patolog

Evaluasi TILs dapat mulai dipertimbangkan sebagai parameter tambahan dalam penilaian histopatologi, terutama pada subtipe HER2 positif dan TNBC yang menunjukkan infiltrasi limfosit tinggi. Integrasi TILs dalam laporan dapat membantu stratifikasi risiko dan mendukung pengambilan keputusan terapi, mengingat temuan penelitian ini menunjukkan bahwa nilai TILs berbeda antar subtipe dan dapat memberi informasi tambahan mengenai karakteristik tumor.

5.2.3 Bagi Institusi Layanan Kesehatan

Institusi layanan kesehatan perlu mempertimbangkan untuk meningkatkan kapasitas dan pelatihan dalam penilaian TILs sesuai panduan *International TILs Working Group* (ITILWG), sehingga evaluasi dapat dilakukan secara lebih konsisten dan terstandarisasi. Penguatan kompetensi tenaga patologis, penyediaan pelatihan berkala, serta penerapan prosedur penilaian yang konsisten akan mendukung pemanfaatan TILs sebagai parameter tambahan dalam pengambilan keputusan klinis.

DAFTAR PUSTAKA

Al Taher, R. S., Abbas, M. A., Halahleh, K., & Sughayer, M. A. 2024. Correlation Between *ImageJ* and Conventional Manual Scoring Methods for Programmed Death-Ligand 1 Immuno-Histochemically Stained Sections. *Technology in cancer research & treatment*. *23:* 1-9

Amgad, M., Stovgaard, E. S., Balslev, E., Thagaard, J., Chen, W., Dudgeon, *et al.* 2020. Report on computational assessment of Tumor Infiltrating Lymphocytes from the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ breast cancer*. *6*: 16.

Anwar, S. L., Raharjo, C. A., Herviastuti, R., Dwianingsih, E. K., Setyoheriyanto, D., Avanti, W. S., *et al.* 2019. Pathological profiles and clinical management challenges of breast cancer emerging in young women in Indonesia: a hospital-based study. *BMC women's health*, *19*(1): 28.

Asano, Y., Kashiwagi, S., Goto, W., Kurata, K., Noda, S., Takashima, T., *et al.* 2016. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treaTMEnt responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *The British journal of surgery*. *103*(7): 845–854.

Bailey, C., Black, J. R. M., Reading, J. L., Litchfield, K., Turajlic, S., McGranahan, N., *et al.* 2021. Tracking Cancer Evolution through the Disease Course. *Cancer discovery*. *11*(4): 916–932.

Bakhoum, S. F., Ngo, B., Laughney, A. M., Cavallo, J. A., Murphy, C. J., Ly, P.,*et al.* 2018. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. *553*(7689): 467–472.

Basic Concepts of *ImageJ*. Tersedia di: https://*ImageJ*.net/ij/docs/concepts.html

Ben-Jonathan, N., Borcherding, D. C., & Hugo, E. R. 2022. Dopamine Receptors in Breast Cancer: Prevalence, Signaling, and Therapeutic Applications. Critical Reviews™ in Oncogenesis. 27(2): 51-71.

Bergamino, M. A., López-Knowles, E., Morani, G., Tovey, H., Kilburn, L., Schuster, E. F., *et al.* 2022. HER2-enriched subtype and novel molecular subgroups drive aromatase inhibitor resistance and an increased risk of relapse in early ER+/HER2+ breast cancer. *EbioMedicine*. *83*: 104205.

Bertucci, F., Ng, C. K. Y., Patsouris, A., Droin, N., Piscuoglio, S., Carbuccia, N., *et al.* 2019. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature*. *569*(7757): 560–564.

Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. 2016. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews. Clinical oncology*. *13*(11): 674–690.

Bianchini, G., De Angelis, C., Licata, L., & Gianni, L. 2022. Treatment landscape of triple-negative breast cancer - expanded options, evolving needs. *Nature reviews. Clinical oncology*. *19*(2): 91–113.

Blackley, E. F., & Loi, S. 2019. Targeting immune pathways in breast cancer: review of the prognostic utility of TILs in early stage triple negative breast cancer (TNBC). *Breast (Edinburgh, Scotland)*. *48 Suppl 1*: S44–S48.

Burstein, H. J., Curigliano, G., Loibl, S., Dubsky, P., Gnant, M., Poortmans, P., *et al.* 2019. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. *30*(10): 1541–1557.

Chatzopoulos, K., Kotoula, V., Manoussou, K., Markou, K., Vlachtsis, K., Angouridakis, N., *et al.* 2020. Tumor Infiltrating Lymphocytes and CD8+ T Cell Subsets as Prognostic Markers in Patients with Surgically Treated Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Head and neck pathology*. *14*(3): 689–700.

Chen, X., Kang, D., Han, Z., Huang, J., Lu, Z., He, J., *et al.* 2025. Prognostic Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Luminal B Breast Cancer Based on Multiphoton Microscopy. *Journal of biophotonics*, e202500281. Advance online publication.

Cho, M. G., Kumar, R. J., Lin, C. C., Boyer, J. A., Shahir, J. A., Fagan-Solis, K., *et al.* 2024. MRE11 liberates cGAS from nucleosome sequestration during tumorigenesis. *Nature*. *625*(7995): 585–592.

Ciarka, A., Piątek, M., Pęksa, R., Kunc, M., & Senkus, E. 2024. Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Prognostic and Predictive Significance across Molecular Subtypes. *Biomedicines*. *12*(4): 763.

Criscitiello, C., Vingiani, A., Maisonneuve, P., Viale, G., Viale, G., & Curigliano, G. 2020. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. *183*(2): 347–354.

Debien, V., De Caluwé, A., Wang, X., Piccart-Gebhart, M., Tuohy, V. K., Romano, E., *et al.* 2023. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. *NPJ breast cancer*. *9*(1): 7.

Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., *et al.* 2018. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet. Oncology*. *19*(1): 40–50.

de Jong, V. M. T., Wang, Y., Ter Hoeve, N. D., Opdam, M., Stathonikos, N., Jóźwiak, K., *et al.* 2022. Prognostic Value of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Young, Node-Negative, Triple-Negative Breast Cancer Patients Who Did Not Receive (neo)Adjuvant Systemic Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. *40*(21): 2361–2374.

Dieci, M. V., Mathieu, M. C., Guarneri, V., Conte, P., Delaloge, S., Andre, F., *et al.* 2015. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. *26*(8): 1698–1704.

Dieci, M. V., Radosevic-Robin, N., Fineberg, S., van den Eynden, G., Ternes, N., Penault-Llorca, F., *et al.* 2018. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in cancer biology*. *52*(Pt 2): 16–25.

Duong, T. T., Pham, D. T. N., Duong, H. N. T., Ly, T. T., & Thai, T. A. 2023. Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes Associated with Immunohistopathology and Molecular Subtypes of Breast Cancer in Vietnam. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. *24*(7): 2523–2530.

El Bairi, K., Haynes, H. R., Blackley, E., Fineberg, S., Shear, J., Turner, S., *et al.* 2021. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ breast cancer*. *7*(1): 150

Ferreira, T. & Rasband, W. 2012. *ImageJ* User Guide: *ImageJ*/FIJI 1.46.r. Tersedia di: https://*ImageJ*.nih.gov/ij/docs/guide/

Geurts, V. C. M., Balduzzi, S., Steenbruggen, T. G., Linn, S. C., Siesling, S., Badve, S. S., *et al.* 2024. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With Stage I Triple-Negative Breast Cancer Untreated With Chemotherapy. *JAMA oncology*. *10*(8): 1077–1086.

Gao, Z. H., Li, C. X., Liu, M., & Jiang, J. Y. 2020. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC cancer*. *20*(1): 1150.

Giordano S. H. 2018. Breast Cancer in Men. *The New England journal of medicine*. *378*(24): 2311–2320.

Gómez, V., Eykyn, T. R., Mustapha, R., Flores-Borja, F., Male, V., Barber, P. R., *et al.* 2020. Breast cancer-associated macrophages promote tumorigenesis by suppressing succinate dehydrogenase in tumor cells. *Science signaling*. *13*(652): eaax4585.

Hamy, A. S., Pierga, J. Y., Sabaila, A., Laas, E., Bonsang-Kitzis, H., Laurent, C., *et al.* 2017. Stromal lymphocyte infiltration after neoadjuvant chemotherapy is associated with aggressive residual disease and lower disease-free survival in HER2-positive breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. *28*(9): 2233–2240.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. 2019) Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*. *5*(1): 66.

Hendry, S., Salgado, R., Gevaert, T., Russell, P. A., John, T., Thapa, B., *et al.* 2017. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Advances in anatomic pathology*. *24*(5): 235–251.

Khan, A. A., Ahuja, S., Kiruthikasri, K., & Zaheer, S. 2024. Assessment of stromal tumor-infiltrating lymphocytes in neoadjuvant chemotherapy for invasive breast carcinoma: Predictive insights across molecular subtypes. *Pathology, research and practice*, *260*: 155382.

Khoirunnisa, S. M., Setiawan, D., Postma, M. J., & de Jong, L. A. 2025. Trends in breast cancer in Indonesia from 2017 to 2020: A national-level analysis by age and disease severity. *Cancer treatment and research communications*. *45*: 101000. Advance online publication.

Khoury, T., Nagrale, V., Opyrchal, M., Peng, X., Wang, D., & Yao, S. 2018. Prognostic Significance of Stromal Versus Intratumoral Infiltrating Lymphocytes in Different Subtypes of Breast Cancer Treated With Cytotoxic Neoadjuvant Chemotherapy. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. *26*(8): 523–532.

Kim, J., Harper, A., McCormack, V., Sung, H., Houssami, N., Morgan, E., *et al.* 2025. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nature medicine*. 10.1038/s41591-025-03502-3. Advance online publication.

Kos, Z., Roblin, E., Kim, R. S., Michiels, S., Gallas, B. D., Chen, W., *et al.* 2020. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ breast cancer*. *6*: 17.

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. 2020. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 10th Ed. Philadelphia: Elsevier

Lafci, O., Celepli, P., Seher Öztekin, P., & Koşar, P. N. 2023. DCE-MRI Radiomics Analysis in Differentiating Luminal A and Luminal B Breast Cancer Molecular Subtypes. *Academic radiology*. *30*(1): 22–29.

Lam, B. M., & Verrill, C. 2023. Clinical Significance of Tumour-Infiltrating B Lymphocytes (TIL-Bs) in Breast Cancer: A Systematic Literature Review. *Cancers*. *15*(4): 1164.

Leon-Ferre, R. A., Jonas, S. F., Salgado, R., Loi, S., de Jong, V., Carter, J. M., International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. 2024. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA*. *331*(13): 1135–1144.

Li, Y., Huang, M., Wang, M., Wang, Y., Deng, P., Li, C., *et al.* 2024. Tumor cells impair immunological synapse formation via central nervous system-enriched metabolite. *Cancer cell*. *42*(6): 985–1002.e18.

Liefaard, M. C., van der Voort, A., van Seijen, M., Thijssen, B., Sanders, J., Vonk, S., *et al.* 2024. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy and Dual HER2-Blockade. *NPJ breast cancer*. *10*(1): 29.

Liu, H., Lyu, H., Jiang, G., Chen, D., Ruan, S., Liu, S., *et al.* 2022. ALKBH5-Mediated m6A Demethylation of GLUT4 mRNA Promotes Glycolysis and

Resistance to HER2-Targeted Therapy in Breast Cancer. *Cancer research*. *82*(21): 3974–3986.

Loi, S., Drubay, D., Adams, S., Pruneri, G., Francis, P. A., Lacroix-Triki, M., *et al.* 2019. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. *37*(7): 559–569.

Loibl, S., & Gianni, L. 2017. HER2-positive breast cancer. *Lancet (London, England)*. *389*(10087): 2415–2429.

López, S., Lim, E. L., Horswell, S., Haase, K., Huebner, A., Dietzen, M., *et al.* 2020. Interplay between whole-genome doubling and the accumulation of deleterious alterations in cancer evolution. *Nature genetics*. *52*(3): 283–293.

Lu, Y., Tong, Y., Fei, X., Chen, X., & Shen, K. 2023. Clinical characteristics, Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Prognosis in HER2-Low Breast Cancer: A Comparison Study with HER2-zero and HER2-positive Disease. *Cancer medicine*. *12*(15): 16264–16278.

Łukasiewicz, S., Czeczelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. 2021. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers*. *13*(17): 4287.

Lukianova, N., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Chekhun, V. 2024. Development of an algorithm for biomedical image analysis of the spatial organization of collagen in breast cancer tissue of patients with different clinical status. *FEBS open bio*. *14*(4): 675–686.

Makhlouf, S., Wahab, N., Toss, M., Ibrahim, A., Lashen, A. G., Atallah, N. M., *et al.* 2023. Evaluation of Tumour Infiltrating Lymphocytes in Luminal Breast Cancer Using Artificial Intelligence. *British journal of cancer*. *129*(11): 1747–1758.

Martín, M., Yoder, R., Salgado, R., Del Monte-Millán, M., Álvarez, E. L., Echavarría, I., *et al.* 2024. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Refine Outcomes in Triple-Negative Breast Cancer Treated with Anthracycline-Free Neoadjuvant Chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *30*(10): 2160–2169.

Menon, G., Alkabban, F. M., & Ferguson, T. 2025. Breast Cancer. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Mitri, Z. I., Abuhadra, N., Goodyear, S. M., Hobbs, E. A., Kaempf, A., Thompson, A. M., *et al.* 2022. Impact of TP53 mutations in Triple Negative Breast Cancer. *NPJ precision oncology*. *6*(1): 64.

Mohammed, A. A. 2021. Prognostic parameter differences in breast cancer patients between luminal A and luminal B types after application of the new classification according to Ki-67 score. International Journal of Surgery Open. 34 (100357).

Montagna, E., Vingiani, A., Maisonneuve, P., Cancello, G., Contaldo, F., Pruneri, G., *et al.* 2017. Unfavorable prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in hormone-receptor positive, HER2 negative metastatic breast cancer treated with metronomic chemotherapy. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. *34*: 83–88.

Nagarajan, D., & McArdle, S. E. B. 2018. Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines*. *6*(1): 20.

Nieto-Olmedo, P., Martín-Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodríguez, J. M., Peña, F. J., & Ortega-Ferrusola, C. 2020. Power Doppler can detect the presence of 7-8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. *Theriogenology. 145*: 1–9.

Obeagu, E. I., & Obeagu, G. U. 2024. Lymphocyte infiltration in breast cancer: A promising prognostic indicator. *Medicine*. *103*(49): e40845.

Okcu, O., Öztürk, S. D., Öztürk, Ç., Şen, B., Yasin, A. İ., & Bedir, R. 2022. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) volume and prognosis: The value of TILs for survival in HER2 and TN breast cancer patients treated with chemotherapy. *Annals of diagnostic pathology*. *58*: 151930.

Onkar, S. S., Carleton, N. M., Lucas, P. C., Bruno, T. C., Lee, A. V., Vignali, D. A. A., *et al.* 2023. The Great Immune Escape: Understanding the Divergent Immune Response in Breast Cancer Subtypes. *Cancer discovery*. *13*(1): 23–40.

Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. 2022. Chapter 3: Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications.

Osborne, A., Adnani, Q. E. S., & Ahinkorah, B. O. 2025. Breast cancer incidence in Indonesia: a sex-disaggregated analysis using WHO health equity assessment toolkit data. *BMC cancer*. *25*(1): 986.

Paijens, S. T., Vledder, A., de Bruyn, M., & Nijman, H. W. 2021. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cellular & molecular immunology*. *18*(4): 842–859.

Pedroza, D. A., Subramani, R., Tiula, K., Do, A., Rashiraj, N., Galvez, A., *et al.* 2021. Crosstalk between progesterone receptor membrane component 1 and estrogen receptor α promotes breast cancer cell proliferation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. *101*(6): 733–744.

Peterko, A. C., Molek, K. R., Vukovic, A. S., Gulic, T., Zujic, P. V., Tešar, E. C., *et al.* 2025. Quantitative and Qualitative Variations in TILs in Risk Stratification and Patient Selection for Neoadjuvant Chemotherapy of the Luminal B and Triple-Negative Breast Cancer Immunophenotype. *Sci*. 7(49): 69-84

Pujani, M., Jain, H., Chauhan, V., Agarwal, C., Singh, K., & Singh, M. 2020. Evaluation of Tumor infiltrating lymphocytes in breast carcinoma and their correlation with molecular subtypes, tumor grade and stage. *Breast disease*. *39*(2): 61–69.

Rahmawati, Y., Setyawati, Y., Widodo, I., Ghozali, A., & Purnomosari, D. 2018. Molecular Subtypes of Indonesian Breast Carcinomas - Lack of Association with Patient Age and Tumor Size. *Asian Pacific journal of cancer prevention:APJCP*. *19*(1): 161–166.

Rakaee, M., Andersen, S., Giannikou, K., Paulsen, E. E., Kilvaer, T. K., Busund, L. R., *et al.* 2023. Machine learning-based immune phenotypes correlate with STK11/KEAP1 co-mutations and prognosis in resectable NSCLC: a sub-study of the TNM-I trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. *34*(7): 578–588.

Roxanis, I., Colling, R., Kartsonaki, C., Green, A. R., & Rakha, E. A. 2018. The significance of tumour microarchitectural features in breast cancer prognosis: a digital image analysis. *Breast cancer research: BCR*. *20*(1): 11.

Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., *et al.* 2017. *ImageJ*2: *ImageJ* for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*. *18*(1): 529.

Salgado, R., Denkert, C., Campbell, C., Savas, P., Nuciforo, P., Aura, C., *et al.* 2015. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA oncology*. *1*(4): 448–454.

Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., *et al.* 2015. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. *26*(2): 259–271.

Sammut, S. J., Galson, J. D., Minter, R., Sun, B., Chin, S. F., De Mattos-Arruda, L., *et al.* 2024. Predictability of B cell clonal persistence and immunosurveillance in breast cancer. *Nature immunology*. *25*(5): 916–924.

Sarkar, T., Dhar, S., & Sa, G. 2021. Tumor-infiltrating T-regulatory cells adapt to altered metabolism to promote tumor-immune escape. *Current research in immunology*. *2*: 132–141.

Sawe, R. T., Mining, S. K., Ofulla, A. V., Patel, K., Guyah, B., Chumba, D., *et al.* 2017. Tumor infiltrating leukocyte density is independent of tumor grade and molecular subtype in aggressive breast cancer of Western Kenya. Tropical medicine and health. 45: 19.

Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., & Eliceiri, K. W. 2015. The *ImageJ* ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular reproduction and development*. *82*(7-8): 518–529.

Schlam, I., Loi, S., Salgado, R., & Swain, S. M. 2025. Tumor-infiltrating lymphocytes in HER2-positive breast cancer: potential impact and challenges. *ESMO open*. *10*(2): 104120.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to *ImageJ*: 25 years of image analysis. *Nature methods*. *9*(7): 671–675.

Schroeder, A. B., Dobson, E. T. A., Rueden, C. T., Tomancak, P., Jug, F., & Eliceiri, K. W. 2021. The *ImageJ* ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein science : a publication of the Protein Society*. *30*(1): 234–249.

Shaath, H., Elango, R., & Alajez, N. M. 2021. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*. *13*(21): 5350.

Shou, J., Zhang, Z., Lai, Y., Chen, Z., & Huang, J. 2016. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*. *16*(1): 687.

Shvetsov, N., Grønnesby, M., Pedersen, E., Møllersen, K., Busund, L. R., Schwienbacher, R., *et al.* 2022. A Pragmatic Machine Learning Approach to Quantify Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Whole Slide Images. *Cancers*. *14*(12): 2974.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. 2023. Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*. *73*(1): 17–48.

Šimunić, I., Jagečić, D., Isaković, J., Dobrivojević Radmilović, M., & Mitrečić, D. 2024. Lusca: FIJI (*ImageJ*) based tool for automated morphological analysis of cellular and subcellular structures. *Scientific reports*. *14*(1): 7383.

Sinaga, E. S., Ahmad, R. A., Shivalli, S., & Hutajulu, S. H. 2018. Age at diagnosis predicted survival outcome of female patients with breast cancer at a tertiary hospital in Yogyakarta, Indonesia. *The Pan African medical journal*. *31*: 163.

Singh, V., Kaur, R., Kumari, P., Pasricha, C., & Singh, R. 2023. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. *548*: 117487.

Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. 2022. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*. *14*(10): 2569.

Sobral-Leite, M., Salomon, I., Opdam, M., Kruger, D. T., Beelen, K. J., van der Noort, V., *et al.* 2019. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast cancer research: BCR*. *21*(1): 90.

Solinas, C., Carbognin, L., De Silva, P., Criscitiello, C., & Lambertini, M. 2017. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. *35*: 142–150.

Sun, P., He, J., Chao, X., Chen, K., Xu, Y., Huang, Q., *et al.* 2021. A Computational Tumor-Infiltrating Lymphocyte Assessment Method Comparable with

Visual Reporting Guidelines for Triple-Negative Breast Cancer. *EbioMedicine*. *70*: 103492.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. *71*(3): 209–249.

Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. 2023. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature reviews, Drug discovery*. *22*(2): 101–126.

Tan, P. H., Ellis, I., Allison, K., Brogi, E., Fox, S. B., Lakhani, S., *et al.* 2020. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. *77*(2): 181–185.

Tang, B., Qin, C., Liu, H., Miao, S., Xue, C., Wang, Z., *et al.* 2024. Blockade of CCR5 and CXCR3 attenuates murine acute graft-versus-host disease through modulating donor-derived T-cell distribution and function. *International immunology*. *36*(10): 541–552.

Vaid, P. M., Puntambekar, A. K., Jumle, N. S., Banale, R. A., Ansari, D., Reddy, R. R., *et al.* 2022. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in molecular subtypes of an Indian cohort of breast cancer patients. *Diagnostic pathology*. *17*(1): 91.

Valenza, C., Taurelli Salimbeni, B., Santoro, C., Trapani, D., Antonarelli, G., & Curigliano, G. 2023. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers*. *15*(3): 767.

Viale, G., Hanlon Newell, A. E., Walker, E., Harlow, G., Bai, I., Russo, L., *et al.* 2019. Ki-67 (30-9) scoring and differentiation of Luminal A- and Luminal

B-like breast cancer subtypes. *Breast cancer research and treatment*. *178*(2): 451–458.

Wang, E., Shibutani, M., Nagahara, H., Fukuoka, T., Iseki, Y., Okazaki, Y., *et al.* 2021. Abundant intratumoral fibrosis prevents lymphocyte infiltration into peritoneal metastases of colorectal cancer. *PloS one*. *16*(7): e0255049.

Wang, J., & Xu, B. 2019. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal transduction and targeted therapy*. *4*: 34.

World Health Organization. 2022. GLOBOCAN 2022. https://gco.iarc.who.int/media/GLOBOCAN/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheet.pdf

World Health Organization. 2024. Breast Cancer. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer

Widiana, I. K. & Irawan, H. 2020. Clinical and Subtypes of Breast Cancer in Indonesia. Asian Pacific Journal of Cancer Care. 5(4): 281-285

Wu, B., Zhang, B., Li, B., Wu, H., & Jiang, M. 2024. Cold and hot tumors: from molecular mechanisms to targeted therapy. *Signal transduction and targeted therapy*. *9*(1): 274.

Xiong, X., Zheng, L. W., Ding, Y., Chen, Y. F., Cai, Y. W., Wang, L. P., *et al.* 2025. Breast cancer: pathogenesis and treatments. *Signal transduction and targeted therapy*. *10*(1): 49.

Yao, Z., Zeng, Y., Liu, C., Jin, H., Wang, H., Zhang, Y., *et al.* 2024. Focusing on $CD8^+$ T-cell phenotypes: improving solid tumor therapy. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. *43*(1): 266.

Yu, N. Y., Iftimi, A., Yau, C., Tobin, N. P., van 't Veer, L., Hoadley, K. A., *et al.* 2019. Assessment of Long-term Distant Recurrence-Free Survival Associated With Tamoxifen Therapy in PosTMEnopausal Patients With Luminal A or Luminal B Breast Cancer. *JAMA oncology*. *5*(9): 1304–1309.

Zhang, N. N., Qu, F. J., Liu, H., Li, Z. J., Zhang, Y. C., Han, X., *et al.* 2021. Prognostic impact of tertiary lymphoid structures in breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Cancer cell international*. *21*(1): 536.