



UNIVERSITAS INDONESIA

**HUBUNGAN ANTARA GENOTIP DAN FENOTIP CYP2D6
DENGAN KADAR Z-ENDOKSIFEN PADA SUBJEK KANKER
PAYUDARA YANG DITERAPI TAMOKSIFEN**

DISERTASI

**YENNY
NPM: 1506818032**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
JAKARTA
JANUARI 2019**



UNIVERSITAS INDONESIA

**HUBUNGAN ANTARA GENOTIP DAN FENOTIP CYP2D6
DENGAN KADAR Z-ENDOKSIFEN PADA SUBJEK KANKER
PAYUDARA YANG DITERAPI TAMOKSIFEN**

DISERTASI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor dalam Bidang Ilmu Kedokteran pada Universitas Indonesia di Jakarta di bawah pimpinan Rektor Universitas Indonesia untuk dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada hari, Rabu, tanggal 16 Januari 2019, pukul 14.00–16.00 WIB

**YENNY
NPM: 1506818032**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
JAKARTA
JANUARI 2019**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Yenny

NPM : 1506818032

Tanda Tangan :

Tanggal : 16 Januari 2019

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :
Nama : Yenny
NPM : 1506818032
Program Studi : S3 Ilmu Kedokteran
Judul Disertasi :

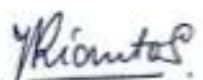
Hubungan antara Genotip dan Fenotip CYP2D6 dengan Kadar Z-Endoksifen pada Subjek Kanker Payudara yang Diterapi Tamoksifen

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi S3 Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

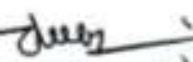
Promotor :

Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, Sp.FK

()

Ko-Promotor :

Dr. dr. Sonar S Panigoro, Sp.B(K)-Onk., M.Epid., M.A.R.S

()

Prof. Dr. dr. Adi Hidayat, MS

()

Tim Penguji :

Dr. dr. Suhendro, Sp.PD-KPTI

(Ketua)

()

Prof. Dr. dr. H. Muchlis Ramli, Sp.B-Onk

(Anggota)

(.....)

Dr. dr. Denni Joko Purwanto, Sp.B-Onk

(Anggota)

()

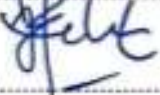
Dr. Dra. Rizka Andalucia, Apt., Pharm

(Anggota)

()

Dr. Melva Louisa, Apt., M.Biomed.

(Anggota)

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 16 Januari 2019

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa saya ucapkan sehingga saya dapat menyelesaikan Pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan pada hari ini saya sampai pada tahap ujian promosi. Saya menyadari bahwa apa yang telah saya capai saat ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan banyak pihak, karena itu perkenankan saya mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi.

Kepada Rektor Universitas Indonesia Prof. Dr. Ir. Muhammad Anis, M. Met., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Prof. Dr. dr. Ari Fahrial Syam, Sp.PD-KGEH., MMB., FINASIM., FACP., beserta jajaran Dekanat atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk dapat menjalani Program Pendidikan S3 Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang beliau pimpin.

Kepada Institusi Beasiswa Unggulan Dosen Indonesia (BUDI) yang merupakan sinergi antara Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemenristekdikti) bersama Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) atas bantuan biaya Pendidikan Program Studi S3 yang diberikan kepada saya.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Trisakti Dr. dr. Raditya Wratsangka, Sp.OG(K) atas dukungan dan motivasi yang diberikan selama saya menempuh pendidikan doktoral dan Dekan Periode sebelumnya dr. Hj. Suriptiastuti, DAP&E, MS atas surat tugas belajar yang diberikan bagi saya sehingga saya dapat menjalani Program Pendidikan S3 Ilmu Kedokteran.

Kepada Dr. dr. Suhendro Sp.PD-KPTI selaku Ketua Program Studi Doktor (S3) Ilmu Kedokteran dan Ketua Dewan Penguji, serta dr. Harrina E. Rahardjo, Sp. U, Ph.D., selaku Sekretaris Program Studi Doktor, yang telah memberikan kesempatan dan waktu agar saya dapat mencari topik riset dan menyusun proposal penelitian sebelum masuk perkuliahan, melakukan fasilitasi, dan mencari solusi setiap kendala yang saya hadapi saat menempuh Program Pendidikan S3 Ilmu Kedokteran.

Kepada Prof. Dr. dr. Sarwono Waspadji, Sp.PD-KEMD., selaku Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran FKUI terdahulu atas dedikasinya yang tinggi dengan cermat memberikan masukan dalam kaidah penulisan tata Bahasa Indonesia, sehingga disertasi ini dapat ditulis dengan baik.

Kepada dr. Alida Roswita Harahap, Sp.PK(K), PhD, selaku Penguji Program Studi Pascasarjana Bidang Kedokteran FKUI, atas bimbingan dan masukan beliau dalam bidang keilmuan genetika karena pengetahuan beliau yang luas berkaitan dengan topik yang saya teliti. Tidak hanya dalam bidang keilmuan, beliau juga selalu mengikuti, membantu, dan mendorong supaya saya bisa selesai tepat waktu.

Kepada Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, Sp.FK, selalu Promotor saya yang dengan sabar selalu membimbing saya mulai dari saat menempuh Pendidikan Program Studi Spesialis Farmakologi Klinik hingga saat ini menjadi Promotor saya. Beliau adalah sosok yang mendorong saya untuk melanjutkan Pendidikan S3. Di dalam diri beliau saya melihat sosok guru sejati, di tengah kesibukannya beliau selalu meluangkan waktu untuk mendengarkan keluhan dan mencari solusi atas masalah yang saya hadapi saat menempuh Pendidikan S3. Rasa hormat, kagum, dan terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan kepada beliau karena beliau tidak hanya mentransfer ilmu pengetahuan tetapi melalui beliau saya banyak belajar pengalaman hidup.

Kepada Kopromotor saya Dr. dr. Sonar Soni Panigoro, Sp.B(K)-Onk. M.Epid., M.A.R.S., saya sampaikan rasa hormat dan terima kasih atas kesediaan beliau membimbing saya di tengah kesibukan beliau. Kontribusi beliau dalam bidang keilmuan onkologi sangat berharga dalam penelitian yang dilakukan ini.

Kepada Kopromotor saya Prof. Dr. dr. Adi Hidayat, MS., saya sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan perhatian yang diberikan kepada saya mulai dari mahasiswa sampai pada waktu saya menempuh pendidikan S3. Melalui beliau saya belajar banyak mulai dari penulisan karya ilmiah hingga ilmu statistika.

Kepada Dr. Melva Louisa, Apt. M.Biomed., saya sampaikan terima kasih atas bantuan, bimbingan beliau khususnya dalam bidang genetika dan pengukuran kadar obat. Beliau selalu menyediakan waktu di antara kesibukannya untuk berdiskusi dan memberikan masukan yang sangat penting bagi terlaksananya penelitian ini.

Kepada Dr. dra. Rizka Andalucia, Apt. Pharm, dalam kontribusi ide penelitian yang diberikan, kesediaan ibu Rizka untuk meluangkan waktu memperkenalkan saya kepada dr. Denni, masukan dalam bidang ilmu genetika, dan atas kesediaan ibu untuk memberikan bantuan khususnya dalam teknis pelaksanaan penelitian genetik.

Kepada Dr. dr. Denni Joko Purwanto, Sp.B(K)-Onk, saya sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan bimbingan yang diberikan mulai dari mengurus izin penelitian, meminta izin mengambil subjek di poli onkologi, dan memberikan sumbangsih pemikiran yang sangat berharga khususnya dalam bidang keilmuan onkologi saat saya melakukan penelitian di RS.Kanker Dharmais.

Kepada Prof. Dr. dr. Pusparini, Sp.PK yang selalu bersedia memberikan bantuan dalam hal teknis laboratorium mulai dari saat saya menempuh Pendidikan spesialis Farmakologi Klinik hingga saat saya menempuh Pendidikan S3.

Kepada Dr. dr. Lyana Setiawan, Sp.FK yang telah memberikan izin untuk menyediakan tempat dan meminjamkan analis laboratoriumnya untuk membantu saya saat mengambil sampel darah di RS. Kanker Dharmais.

Kepada rekan-rekan dosen di Departemen Farmakologi Trisakti, Dr. dr. Elly Herwana, M.Biomed, dr. Laurentia L. Pudjiadi, M.Biomed, dr. Joice V. Kalumpiu, Sp.FK, dr. Kurniasari, M.Biomed, Dr. drg. Didi Santosa, drg. Sheila Soetanto, M.Biomed, dr. J. Tanu Hendrata, dr. Rachman Wahab, yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam tugas di kampus selama saya menempuh Pendidikan S3.

Kepada teman-teman S3 ('the sunshiner') atas kebersamaan, kekompakan, dan dukungan yang diberikan mulai dari saat menempuh perkuliahan S3 hingga saat ini. Semoga kebersamaan ini tetap terjalin selamanya.

Kepada guru-guru saya yang telah mendidik saya mulai dari SD, SMP, SMA, para dosen di FK Universitas Trisakti, dan program Spesialisasi Farmakologi Klinik FKUI.

Kepada Panitia Pelaksana Promosi ini saya ucapkan terima kasih atas segala upaya dan jerih payah yang dilakukan sehingga upacara ini dapat berlangsung dengan baik.

Kepada orang tua, adik saya beserta keluarganya, saya ucapkan terima kasih atas doa restunya. Kepada seluruh keluarga, kerabat dan teman-teman yang telah memberikan dukungannya saya ucapkan terima kasih.

Akhirnya, kepada suamiku Saimon Effendy, S.E., M.M., M.H., atas kesediaannya untuk memberikan izin untuk kuliah dan selalu memberikan bantuan dan dukungannya saat saya menempuh pendidikan S3. Saya ucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya atas pengertian dan pengorbanan yang diberikan. Kepada putriku Sherry Effendy tidak lupa mama ucapkan terima kasih atas segala pengertian dan dukungan yang diberikan.

Sebagai penutup, kepada para hadirin sekalian saya haturkan terima kasih atas kesediaannya meluangkan waktu yang berharga dan dengan sabar mengikuti acara ini. Semoga Tuhan senantiasa memberikan berkat dan bimbingan kepada kita semua.

Jakarta, 16 Januari 2019

Yenny

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yenny
NPM : 1506818032
Program Studi : S3
Departemen : Ilmu Kedokteran
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Disertasi

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Hubungan antara Genotip dan Fenotip CYP2D6 dengan Kadar Z-Endoksifen pada Subjek Kanker Payudara yang Diterapi Tamoksifen

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 16 Januari 2019

Yang menyatakan

(Yenny)

ABSTRAK

Nama : Yenny
Program Studi : Program Doktor Ilmu Kedokteran
Judul disertasi : Hubungan antara Genotip dan Fenotip CYP2D6 dengan Kadar Z-Endoksifen pada Subjek Kanker Payudara yang Diterapi Tamoksifen

Tamoksifen (TAM) merupakan *prodrug* yang perlu diaktivasi oleh CYP2D6 menjadi Z-endoksifen (Z-END). Efek antiestrogen TAM bersifat *concentration dependent*, dan diketahui dari penelitian sebelumnya bahwa *minimal threshold concentration* (MTC) Z-END adalah 5,9 ng/mL.

Penelitian ini bertujuan menentukan persentase penderita kanker payudara (KPD) yang mencapai MTC Z-END pada saat *steady state*, hubungan genotip, fenotip, dan berbagai variabel terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma, dan variabel yang paling berperan dalam pencapaian kadar Z-END.

Penelitian *cross sectional* dilakukan di RS.Kanker Dharmais pada bulan Oktober 2017–Februari 2018 terhadap 125 penderita KPD rawat jalan yang mengonsumsi TAM 20 mg/hari minimal 4 bulan. Tiga jam pasca minum sirup dekstrometorfan 30 mg dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar Z-END, serta *genotyping* dan *phenotyping* CYP2D6. Analisis deskriptif dilakukan pada semua variabel yang diteliti. Uji Chi-square dan Fisher digunakan untuk menentukan hubungan genotip, fenotip, karakteristik demografik, dan klinis terhadap pencapaian kadar Z-END. Analisis regresi logistik dilakukan pada variabel-variabel yang memenuhi syarat untuk menentukan variabel yang paling berperan dalam pencapaian kadar Z-END plasma. Batas kemaknaan statistik yang digunakan adalah $p < 0,05$.

Penderita KPD yang mencapai kadar MTC Z-END $\geq 5,9$ ng/mL pada saat *steady state* ada 52,8%. Persentase genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) adalah C/C (22,4%), C/T(29,6%), dan T/T (48%). Persentase *poor metabolizer* (48,8%) dan *non-poor metabolizer* (51,2%). Tidak ditemukan hubungan bermakna antara genotip CYP2D6*10 (c.100C>T), karakteristik demografik, dan karakteristik klinis terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state*. Analisis multivariat menunjukkan fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan bermakna terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma saat *steady state*. (OR = 0,064; 95%IK 0,018–0,227; $p < 0,001$).

Simpulan: Fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan secara bermakna terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.

Kata Kunci: CYP2D6*10 (c.100C>T), fenotip, genotip, kanker payudara, tamoksifen, Z-endoksifen

ABSTRACT

Name : Yenny
Study Program : Doctoral Program
Dissertation title : Association of CYP2D6 Genotype and Phenotype with Z-Endoxifen Concentration in Subjects with Breast Cancer Treated with Tamoxifen

Tamoxifen (TAM) is a prodrug that needs to be activated by CYP2D6 into Z-endoxifen (Z-END). The anti-estrogenic effect of TAM is concentration dependent and it is known from previous studies that the minimal threshold concentration (MTC) of Z-END is 5.9 ng/mL.

The purpose of the present study was to determine the percentage of patients with breast cancer (BC) who attain steady state Z-END MTC, as well as the association of the phenotype, genotype, and several other variables with the attainment of plasma Z-END concentrations, and to find the variable with the greatest role in the attainment of the Z-END concentrations.

This cross-sectional study was conducted at the Dharmais Cancer Hospital from October 2017 to February 2018 on 125 ambulatory BC patients who consumed TAM at 20 mg/day for a minimum of 4 months. Three hours after administration of 30 mg dextrometorphan syrup the subjects underwent collection of venous blood samples for determination of plasma Z-END concentration, as well as CYP2D6 genotyping and phenotyping. Descriptive analysis was performed on all variables under study. The chi-square test and Fisher's test were used to determine the association of genotype, phenotype, demographic characteristics, and clinical characteristics with attainment of Z-END concentrations. Logistic regression analysis was used on variables meeting the requirements to determine the variable with the greatest role in the attainment of the plasma Z-END concentrations. The limit of statistical significance used was $p < 0.05$.

The proportion of BC patients who attained a steady state Z-END MTC of ≥ 5.9 ng/mL was 52.8%. The percentages of the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes C/C, C/T, and T/T were 22.4%, 29.6%, and 48%, respectively. The percentages of poor metabolizers and non-poor metabolizers were 48.8% and 51.2%, respectively. There was no significant association of the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotype, demographic characteristics, and clinical characteristics with attainment of steady state plasma Z-END concentrations. Multivariate analysis showed that phenotype was the sole variable that had a significant association with attainment of steady state plasma Z-END concentrations (OR = 0.064; 95%CI 0.018–0.227; $p < 0.001$).

Conclusion: Phenotype is the sole variable that has a significant association with attainment of steady state plasma Z-END concentrations in BC patients in Indonesia.

Keywords: breast cancer, CYP2D6*10 (c.100C>T), genotype, phenotype, tamoxifen, Z-endoxifen

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	xi
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	xxiv
1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.3.2.1 Tujuan Utama	4
1.3.2.2 Tujuan Tambahan	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian	6
1.5.1 Akademik	6
1.5.2 Kebijakan Kesehatan	6
1.5.3 Penelitian Lebih Lanjut	6
1.6 Kebaruan Penelitian	6
2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kanker Payudara	7
2.1.1 Etiologi	7
2.1.2 Patogenesis	7
2.1.2.1 Estrogen	7
2.1.2.2 Reseptor estrogen	9
2.1.2.3 Reseptor Estrogen sebagai Reseptor Nukleus	10
2.1.2.4 Aktivasi Reseptor Estrogen pada Kanker Payudara .	13
2.1.3 Klasifikasi Kanker Payudara	15
2.1.3.1 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut <i>the</i> <i>American Joint Committee on Cancer</i>	16
2.1.3.2 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut Histologi	19
2.1.3.3 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut Molekular ...	20
2.1.3.4 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut <i>the St. Gallen</i> <i>International Expert Consensus on the Primary</i> <i>Therapy of Early Breast Cancer</i>	20
2.1.4 Diagnosis	21

2.1.5 Tatalaksana	21
2.1.5.1 Terapi Hormon	22
2.1.5.1.1 Jenis Terapi Hormon	22
2.1.5.1.2 Indikasi Terapi hormon	23
2.1.5.1.3 Tatalaksana Kanker Payudara menurut Beberapa <i>Guideline</i>	23
2.2 Respons Terapi	27
2.2.1 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Respons Terapi Individu.....	28
2.2.1.1 Faktor Genetik dalam Respons Terapi	29
2.2.1.2 Faktor-Faktor Lain yang Berperan dalam Respons Terapi Kanker Payudara	31
2.3 Sitokrom P450	34
2.3.1 Famili Sitokrom P450	34
2.3.2 Substrat CYP2D6	35
2.3.3 Lokus Gen CYP2D6	35
2.3.4 Prediksi Fenotip CYP2D6 Berdasarkan Alel Gen CYP2D6	38
2.3.5 Distribusi Polimorfisme Genetik CYP2D6 antara Etnik	39
2.4 Modulator Reseptor Estrogen	39
2.4.1 Tamoksifen	40
2.4.1.1 Struktur	40
2.4.1.2 Mekanisme Kerja	41
2.4.1.3 Farmakokinetik	43
2.4.1.3.1 <i>Prodrug</i> dan Metabolit aktif	46
2.4.1.3.2 Efek Metabolit Aktif terhadap Farmakokinetik.....	46
2.4.1.4 Efek Samping	48
2.4.1.5 <i>Adherence</i> dan <i>Persistence</i>	50
2.5 Endoksifen	51
2.5.1 Antiproliferatif Endoksifen (<i>Studi in Vitro</i>).....	51
2.5.2 Polimorfisme CYP2D6 dan Respons Terapi	52
2.5.3 Hubungan Kadar Endoksifen Plasma dengan Fenotip CYP2D6 dan Respons Terapi	54
2.5.4 Efek Peningkatan Dosis Tamoksifen terhadap Kadar Endoksifen Plasma	56
2.5.5 Faktor Lain yang Memengaruhi Kadar Endoksifen dalam Plasma	67
2.6 <i>Phenotyping</i> Aktivitas Metabolik CYP2D6	67
2.6.1 Dekstrometorfan.....	68
2.6.2 <i>Phenotyping</i> Menggunakan Dekstrometorfan	70
2.7 Kerangka Teori	71
2.8 Kerangka Konsep	73
3 METODE	71
3.1 Desain	71
3.2 Tempat dan Waktu	71
3.3 Populasi dan Sampel	71
3.3.1 Populasi Target	71

3.3.2	Populasi Terjangkau	71
3.3.3	Sampel	71
3.4	Kriteria Seleksi	71
3.4.1	Kriteria Inklusi	71
3.4.2	Kriteria Eksklusi	71
3.5	Besar Sampel	72
3.6	Bahan dan Cara Kerja	75
3.6.1	<i>Genotyping</i> Gen CYP2D6*10 (c.100CT)	75
3.6.1.1	Bahan dan Alat	75
3.6.1.2	Isolasi DNA	76
3.6.1.3	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Gen CYP2D6*10	77
3.6.1.4	Pembuatan Gel Agarose.....	78
3.6.1.5	Elektroforesis	79
3.6.1.6	Purifikasi Produk PCR.....	79
3.6.1.7	Digesti Produk PCR dengan Enzim Restriksi	80
3.6.1.8	Sekuensing Gen CYP2D6*10 (c.100C>T).....	80
3.6.2	Pengukuran Kadar Z-endoksifen, Dekstrometorfan dan Dekstorfkan dalam Plasma	81
3.6.2.1	Bahan dan Alat.....	81
3.6.2.2	Kondisi Kromatografi dan Spektrofotometri Massa..	82
3.6.2.3	Penyiapan Larutan Kerja, Standar Kalibrasi, dan Sampel Kontrol Kualitas	82
3.6.2.4	Persiapan Sampel Plasma	82
3.6.2.5	Validasi Metode Bioanalisis	83
3.6.2.5.1	Selektivitas	83
3.6.2.5.2	<i>Carry Over</i>	83
3.6.2.5.3	<i>Lowest Limit of Quantification</i>	83
3.6.2.5.4	Kurva Kalibrasi	84
3.6.2.5.5	Akurasi dan Presisi	84
3.6.2.5.6	Efek Matrik	84
3.6.2.5.7	Stabilitas	85
3.6.2.5.8	Integritas Disolusi	85
3.7	Variabel Penelitian	85
3.7.1	Variabel Bebas	85
3.7.2	Variabel Tergantung	86
3.8	Definisi Operasional	86
3.9	Alur Kerja Penelitian	96
3.10	Analisis Data	98
3.11	Etika Penelitian	99
4	HASIL	101
4.1	Alur Pelaksanaan Studi	101
4.2	Karakteristik Dasar Subjek Studi	102
4.3	<i>Genotyping</i> Gen CYP2D6*10 (c.100C>T).....	104
4.4	Validasi Metode Bioanalitik	108
4.4.1.	Selektivitas	108
4.4.2	<i>Carry Over</i>	109

4.4.3	<i>Lowest Limit of Quantification</i>	109
4.4.4	Kurva Kalibrasi	109
4.4.5	Akurasi	110
4.4.6	Presisi	111
4.4.7	Efek Matriks	111
4.4.8	Stabilitas	111
4.4.9	<i>Dilution Integrity</i>	112
4.5	CYP2D6 <i>Phenotyping</i>	114
4.5.1	Rasio Metabolik Dekstrometorfan/Dekstrorfan (MR DMP/DX)	114
4.5.2	Frekuensi <i>Poor Metabolizer</i> dan <i>Non-Poor</i> <i>Metabolizer</i> dari Gen CYP2D6*10 (c.100 C>T)	116
4.6	Kadar Z-END dalam Plasma	118
4.7	Hubungan Karakteristik Demografik, Klinik, Genotip, dan Fenotip dengan Subjek Studi dengan Pencapaian Kadar Z-END Plasma	118
4.8	Analisis Multivariat	120
4.9	Penggunaan Obat Lain bersama Tamoksifen	121
4.10	Interaksi Obat Potensial	122
4.11	<i>Adverse Event</i>	123
5	PEMBAHASAN	125
5.1	Persentase Penderita KPD yang Mencapai MTC Z-END	125
5.2	<i>Genotyping</i> Gen CYP2D6*10 (c.100C>T)	128
5.3	Hubungan Genotip Gen CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan Kadar Z-END Plasma	130
5.4	<i>Phenotyping</i> CYP2D6	134
5.5	Hubungan Fenotip CYP2D6 terhadap Pencapaian Kadar Z-END	138
5.6	Hubungan Berbagai Variabel Dasar dan Klinik terhadap Kadar Z- END Plasma	138
5.6.1	Usia	138
5.6.2	Indeks Massa Tubuh dan <i>Waist/Hip Ratio</i>	139
5.6.3	Usia Saat Diagnosis	141
5.6.4	Status Menopause	141
5.6.5	Waktu Minum Tamoksifen	143
5.6.6	Tumor, Nodul, Metastasis, dan Stadium KPD	144
5.6.7	Reseptor Estrogen, Reseptor Progesteron, HER-2, Ki-67, dan Subtipe Molekuler	145
5.6.8	<i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>	145
5.6.9	Rasio <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase/Serum</i> <i>Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i> dan <i>Nonalcoholic</i> <i>Fatty Liver Disease</i>	147
5.6.10	Riwayat Kemoterapi Sebelumnya	150
5.6.11	<i>Adherence</i>	150
5.7	Analisis Multivariat	152
5.8	Obat-Obat yang Dikonsumsi Bersama Tamoksifen	152
5.9	Interaksi Obat	153
5.9.1	Rifampisin	154

5.9.2 Sertralin	155
5.9.3 Masalahan Studi Interaksi Obat	158
5.10 <i>Adverse Event</i>	158
5.10.1 <i>Hot Flashes</i>	158
5.10.2 Sistem Muskuloskeletal	160
5.10.3 Hiperplasia Endometrial	162
5.10.4 Depresi	164
5.11 Kelebihan dan Keterbatasan Studi	166
5.12 Implikasi Klinis	166
6 Simpulan dan Saran	167
6.1 Simpulan	167
6.2 Saran	167
RINGKASAN	169
SUMMARY.....	175
DAFTAR PUSTAKA	181
LAMPIRAN	205
DRAFT PUBLIKASI	229
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	251

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Stadium Kanker Payudara Berdasarkan Klasifikasi <i>the American Joint Committee on Cancer</i> 2010	16
Tabel 2.2.	Subtipe Molekular dan Klinikopatologi Kanker Payudara ...	21
Tabel 2.3.	Ringkasan Pustaka	64
Tabel 3.1.	Definisi Operasional	92
Tabel 4.1.	Distribusi Karakteristik Dasar Subjek Studi	106
Tabel 4.2.	Hubungan Karakteristik Demografik, Klinik, Genotip, dan Fenotip dengan Subjek Studi dengan Pencapaian Kadar Z-END Plasma	123
Tabel 4.3.	Analisis Regresi Logistik Ganda antara Genotip dan Fenotip dengan Pencapaian Kadar Z-END Plasma.....	125
Tabel 4.4.	Obat-Obat Lain yang Digunakan Bersama Tamoksifen	126
Tabel 4.5.	Penggunaan Obat-Obat Lain yang Dapat Memengaruhi Enzim yang Memetabolisme Tamoksifen	127
Tabel 4.6.	<i>Adverse Event</i>	128
Tabel 4.7.	<i>Adverse Event</i> dan Pencapaian Kadar Z-END	128

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Jalur Sintesis Estrogen	8
Gambar 2.2.	Struktur Reseptor Estrogen	12
Gambar 2.3.	Konformasi Heliks 12 terhadap Agonis dan Antagonis pada <i>Ligand Binding Domain</i> Reseptor Estrogen	13
Gambar 2.4.	Mekanisme Aktivasi Reseptor Estrogen	15
Gambar 2.5.	Pemilihan Terapi Ajuvan Sistemik Berdasarkan Ekspresi Biomarker dan Fenotip Intrinsik	24
Gambar 2.6.	Kurva Dosis - Respons Terapi	28
Gambar 2.7.	Distribusi Fenotip Populasi Akibat Respons Terapi	30
Gambar 2.8.	Pengelompokan Alel CYP2D6 dan <i>Single Nucleotide Polimorphism</i> pada Gen CYP2D6	36
Gambar 2.9.	Polimorfisme Alel CYP2D6*10 (c.100C>T) dan Efek terhadap Aktivitas Metaboliknya	37
Gambar 2.10.	Distribusi Genotip dan Fenotip CYP2D6 Akibat Metabolisme Oksidasi <i>Sparteina</i> pada Populasi	38
Gambar 2.11.	Struktur Kimia dan Formula Empiris Tamoksifen Sitrat	41
Gambar 2.12.	Mekanisme Kerja <i>Selective Estrogen Modulator</i> pada Reseptor Estrogen	43
Gambar 2.13.	Biotransformasi Tamoksifen Menjadi Endoksifen	45
Gambar 2.14.	<i>Formation Rate-Limiting</i> dan <i>Elimination Rate-Limiting Kinetics</i> Metabolit	47
Gambar 2.15.	Jalur Metabolisme Dekstrometorfan	69
Gambar 2.16.	Kerangka Teori Faktor-Faktor yang Berpengaruh terhadap Kadar Endoksifen	72
Gambar 2.17.	Kerangka Konsep Hubungan Genotip CYP2D6*10 (c.100C>T), Fenotip, Karakteristik Demografik, dan Klinik dengan Pencapaian Kadar Z-END	74
Gambar 3.1.	Alur Perekrutan Subjek	102
Gambar 4.1.	Alur Pelaksanaan Studi	105
Gambar 4.2.	Hasil PCR RFLP Gen CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan Enzim HphI.....	109
Gambar 4.3.	Hasil Sekuensing Tiga Sampel dengan Genotip CYP2D6*10 yang Berbeda.....	110
Gambar 4.4.	Hasil Sekuensing Lima Sampel PCR Negatif	111
Gambar 4.5.	Frekuensi Genotip CYP2D6*10 (c.100C>T)	111

Gambar 4.6	Median Kadar Z-END Berdasarkan Genotip CYP2D6*10.	112
Gambar 4.7.	Kromatogram Endoksifen, Dekstrometorfan, dan Dekstrorfan	117
Gambar 4.8.	Histogram Rasio Metabolik Dekstrometorfan/Dekstrorfan	118
Gambar 4.9.	Kurva ROC Ratio Dekstrometorfan/Dekstrorfan	119
Gambar 4.10.	Penentuan Titik Potong Fenotip CYP2D6	120
Gambar 4.11.	Persentase <i>Poor Metabolizer</i> dan <i>Non-Poor Metabolizer</i> dari Gen CYP2D6*10 (c.100C>T)	121
Gambar 4.12.	Median Kadar Z-END Berdasarkan Fenotip CYP2D6.....	121
Gambar 4.13.	Persentase Subjek Studi yang Mencapai MTC Z-END....	122

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Persetujuan Komisi Etik FK. Universitas Indonesia	253
Lampiran 2.	Surat Persetujuan Komite Etik RS. Kanker Dharmais ...	254
Lampiran 3.	Surat Izin Lokasi Penelitian RS. Kanker Dharmais	255
Lampiran 4.	Formulir Identitas Subjek Tamoksifen	256
Lampiran 5.	Formulir Lembar Informasi untuk Subyek Studi (<i>informed consent</i>).....	257
Lampiran 6.	Formulir Lembar Persetujuan Setelah Penjelasan	260
Lampiran 7.	Formulir Pengumpulan Data	261
Lampiran 8.	Formulir Pengambilan Darah	272
Lampiran 9.	<i>Case Report Form</i>	273
Lampiran 10.	Formulir Waktu Pengambilan Darah	274
Lampiran 11.	Formulir Rekapitulasi Subjek Tamoksifen	275

DAFTAR SINGKATAN

ABCSG-8	= <i>Austrian Breast and Colorectal Study-8</i>
AF-1	= <i>activation function-1</i>
AF-1	= <i>activation function-2</i>
Asetil-KoA	= asetil-koenzim A
AI	= inhibitor aromatase
AJCC	= <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	= serin/treonin kinase
ALT	= alanin aminotransferase
ASCO	= <i>American Society of Clinical Oncology Practice</i>
ASCO/CAP	= <i>American Society of Clinical Oncology Practice/ College of American Pathologists</i>
AST	= aspartat aminotransferase
ATAC	= <i>Arimidex Tamoxifen Alone or in Combination</i>
AUC	= <i>area under curve</i>
BCPT-MSS	= <i>Breast Cancer Prevention Trial Menopausal Symptom Scale</i>
BIG	= <i>Breast International Group</i>
BMD	= <i>bone mineral density</i>
BSO	= bilateral salpingo oophorectomy
C/C	= homozygote wild-type
ChT	= kemoterapi
CISH/FISH	= <i>chromogenic in situ hybridization/fluorescence in situ hybridization</i>
CoA	= koaktivator
CoR	= korepresor
CPIC	= <i>Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium</i>
Css	= <i>steady state concentration</i>
C/T	= heterozygote mutan
CV	= <i>coefficient of variation</i>
CYP	= sitokrom P450
DBD	= <i>DNA binding domain</i>
DCIS	= duktal karsinoma in situ
DFS	= <i>disease free survival</i>
DMP	= dekstrometorfan
DNA	= asam deoksiribonukleat
DX	= dekstrorfan
E1	= estron
E2	= 17 β -estradiol
E3	= estriol
EDTA	= <i>ethylenediaminetetra acetic acid</i>
EGFR	= <i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	= <i>European Medicine Agency</i>
END	= endoksifen
ERE	= <i>estrogen response element</i>
ERK	= <i>extracellular signal regulated kinase</i>
ESMO	= <i>European Society for Medical Oncology</i>
ET	= terapi endokrin

EtBr	= <i>ethidium bromide</i>
ER α	= <i>receptor estrogen α</i>
ER β	= <i>receptor estrogen β</i>
FACT-ESS-19	= <i>Fuctional Assessment of Cancer Therapy-Endocrine Symptom Subscale</i>
FDA	= <i>Food and Drug Administration</i>
FFEP	= <i>formalin fixed paraffin embedded</i>
FSH	= <i>follicle stimulating hormone</i>
FXR	= <i>farnesoid x receptor</i>
GnRH	= <i>gonadotropin releasing hormone</i>
HAT	= <i>histon asetiltransferase</i>
HER-2	= <i>human epidermal growth factor-2</i>
HNF-4a	= <i>hepatocyte nuclear factor</i>
HPLC	= <i>high performance liquid chromatography</i>
HR	= <i>hazard ratio</i>
IC _{90%}	= <i>inhibitory concentration 90%</i>
IGFR	= <i>insulin like growth factor</i>
IK95%	= <i>interval kepercayaan 95%</i>
IM	= <i>intermediate metabolizer</i>
IMT	= <i>indeks massa tubuh</i>
IS	= <i>internal standard</i>
ITPC	= <i>International Tamoxifen Pharmacogenomic Concoortium</i>
KPD	= <i>kanker payudara</i>
LCIS	= <i>lobular karsinoma in situ</i>
LLOQ	= <i>lower limit of quantification</i>
M	= <i>metastasis jauh</i>
MAPK	= <i>mitogen activated protein kinase</i>
MCF-7	= <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MF	= <i>matrix factor</i>
MPR	= <i>medication possession ratio</i>
MR	= <i>rasio metabolik</i>
MR DMP/DX	= <i>rasio metabolik dekstrometorfan/dekstrofan</i>
MRI	= <i>magnetic resonance imaging</i>
MRN	= <i>modulation reaction monitoring</i>
MTA	= <i>material transfer agreement</i>
MTC	= <i>minimal threshold concentration</i>
N	= <i>kelenjar getah bening regional</i>
NAFLD	= <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	= <i>nson-alcoholic steatohepatitis</i>
NAT-2	= <i>N-asetil-transferase-2</i>
NCCN	= <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NFD	= <i>N-terminal-domain</i>
NTC	= <i>no templete control</i>
OFS	= <i>ovarian function suppression</i>
OR	= <i>odds ratio</i>
OS	= <i>overall survival</i>
PCR	= <i>polymerase chain reaction</i>
PERABOI	= <i>Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia</i>

PgR	= reseptor progesterone
PI3K	= fosfatidilinositid 3-kinase
PM	= <i>poor metabolizer</i>
PSA	= <i>polar surface area</i>
QC	= <i>quality control</i> /kontrol kualitas
r	= koefisien korelasi
RFLP	= <i>restriction fragment length polymorphism</i>
ROC	= <i>receiver operator curve</i>
rpm	= rotasi per menit/revolusi per menit
RR	= risiko relatif
RT	= terapi radiasi
SCD	= <i>stearoyl-CoA desaturase</i>
SERD	= <i>selective estrogen receptor downregulation</i>
SERM	= <i>selective estrogen receptor modulator</i>
SGOT	= <i>serum glutamic oxaloacetic transaminase</i>
SGPT	= <i>serum glutamic pyruvate transaminase</i>
SHP	= <i>small heterodimer partner</i>
SN	= <i>subject number</i>
SNP	= <i>single nucleotide polymorphism</i>
SNV	= <i>single nucleotide variant</i>
SRC	= <i>steroid receptor coactivator</i>
SREBP-1c	= <i>sterol regulatory element binding protein-1c</i>
StAR	= <i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
SULT	= sulfotransferase
SULT1A1	= <i>Sulfotransferase Family 1A Member 1</i>
T	= tumor primer
TAM	= tamoksifen
TBE	= trisborate EDTA
Tg-CYP	= <i>CYP2D6 humanized transgenic</i>
Tis	= karsinoma in situ
TNBC	= <i>triple negative breast cancer</i>
T/T	= homozigot mutan
t _{1/2}	= waktu paruh
UGT	= uridin-5-difosfo-glukuronosiltransferase
UL	= ubiquitin ligase
ULOQ	= <i>upper limit of quantification</i>
UM	= <i>ultrarapid metabolizer</i>
UPLC/MS	= <i>ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric</i>
v	= varian
VDR	= reseptor vitamin D
RXR	= <i>retinoid X receptor</i>
WHEL	= <i>Women's Healthy and Living</i>
WHR	= <i>waist to hip ratio</i>
Wt	= <i>wild-type</i>
Z-END	= zusammen-endoksifen
1,25-OH-vit D	= 1,25-dihidroksi-vitamin D

25-OH-vit D	= 25-hidroksi-vitamin D
3-MEM	= 3- <i>methoxy-morphinan</i>
3-OH-M	= 3-hidroksi- <i>morphinan</i>
4-OH-TAM	= 4-hidroksi-TAM

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara (KPD) merupakan satu dari lima keganasan yang banyak ditemukan di dunia,¹ termasuk di Indonesia. Data registrasi kanker RS. Kanker Dharmas menunjukkan KPD merupakan keganasan tersering yang ditemukan pada perempuan dan terjadi peningkatan prevalensi KPD dari 38,65% menjadi 43,4% (tahun 2010–2013). Kejadian mortalitas KPD di Indonesia diketahui sebesar 18,6 per 100.000¹ ini menyebabkan Indonesia menduduki peringkat kedua dalam hal mortalitas akibat KPD di dunia.² Besarnya masalah yang dihadapi menyebabkan diperlukan perhatian dalam penanganan KPD.

Beberapa faktor prognostik (faktor–faktor yang berhubungan dengan *disease-free* atau *overall survival* tanpa keberadaan terapi sistemik adjuvan)³ diketahui dapat memengaruhi respons terapi KPD antara lain keterlibatan kelenjar limfe nodus aksilaris, ukuran tumor, reseptor estrogen α (ER α), reseptor progesteron (PgR), kecepatan proliferasi (Ki-67), *human epidermal growth factor-2* (HER2), stadium, karakteristik histologi, subtipe molekular, invasi limfatik dan vaskular, usia pada saat didiagnosis KPD,^{3, 4} dan obesitas.⁵ Selain itu adanya perbedaan karakteristik penderita KPD antar etnik merupakan faktor yang berperan dalam respons terapi.^{6, 7}

Karakteristik penderita KPD di Indonesia paling banyak dijumpai pada kelompok usia 45–55 tahun, dengan gambaran distribusi sebagai berikut: stadium 1 (4,5%), stadium 2 (20,8%), stadium 3 (25,6%), 4 (15,1%), tidak diketahui (29,0%), dengan reseptor hormon positif (76,12%).⁸ Adanya perbedaan karakteristik penderita KPD Indonesia dengan etnik lainnya menyebabkan masih diperlukan identifikasi faktor yang berperan dalam variasi respons terapi.

*The St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*⁹ membagi KPD menjadi 4 subtipe molekular intrinsik yaitu luminal A, luminal B, HER2-positif (non-luminal), dan *triple negatif breast cancer* (TNBC) berdasarkan ada atau tidaknya ekspresi ER, PgR, HER2-positif, dan peningkatan antigen Ki-67. Berdasarkan subtipe molekular penderita KPD maka akan ditentukan terapi yang diberikan.

Tamoksifen (TAM) merupakan terapi hormon adjuvan, neoadjuvan, dan primer yang digunakan saat ini pada penderita KPD pramenopause dan pascamenopause dengan reseptor hormon positif (luminal A dan B),^{10, 11} termasuk di Indonesia.¹² TAM merupakan *prodrug* yang perlu diaktivasi terutama oleh CYP2D6 menjadi endoksifen (END).¹³ Potensi antiestrogen 4-hidroksi-TAM (4-OH-TAM) dan END dalam menekan proliferasi KPD dependen estrogen mencapai hingga 100 kali lipat bila dibandingkan TAM.¹⁴ Pada subjek yang menggunakan TAM potensi END sebanding dengan 4-OH-TAM, namun kadarnya dalam plasma lebih dari 6 kali lipat kadar 4-OH-TAM. Hal ini menyebabkan END dianggap sebagai metabolit utama yang berperan pada keberhasilan terapi.^{15, 16}

Pada penggunaan TAM masih banyak penderita yang mengalami kekambuhan selama terapi 5 tahun.¹⁷ Salah satu faktor yang berperan sebagai penyebab kekambuhan ini adalah kadar *Zusammen* (Z)-END yang memperlihatkan variasi inter-individu yang luas.¹⁸ Madlensky *et al.*¹⁷ menunjukkan kadar Z-END di atas *minimal threshold concentration* (MTC) 5,9 ng/mL mempunyai risiko 26% lebih rendah mengalami kekambuhan secara bermakna dibandingkan dengan kelompok yang kadar Z-END di bawah 5,9 ng/mL. Berdasarkan hasil studi tersebut maka kadar Z-END potensial digunakan sebagai *indirect marker* untuk memprediksi respons terapi TAM. Ada banyak faktor yang menyebabkan bervariasinya kadar END dalam plasma antara lain dosis TAM yang tidak adekuat,¹⁹ *adherence*,²⁰ usia,²¹ indeks masa tubuh,²² variasi musim,²³ waktu pemberian obat,²⁴ interaksi obat,^{25, 26} genotip CYP2D6,^{17, 27, 28} dan fenotip CYP2D6.²⁷

Tinggi rendahnya kadar MTC Z-END antara lain dipengaruhi oleh polimorfisme genetik CYP2D6 yang akan mengubah fungsi dan atau jumlah produk gen yang dihasilkan. Subjek yang memiliki dua *null alleles/poor metabolizer* dilaporkan memiliki kadar Z-END yang lebih rendah dan respons terapi yang jelek.¹⁷ Di Asia frekuensi *poor metabolizer* rendah (< 1 %),²⁹⁻³¹ namun alel CYP2D6*10 yaitu alel dengan fungsi berkurang/*intermediate metabolizer* sering ditemukan di Asia (28,9–58,5%).^{32, 33}

Lei *et al.*³⁴ melakukan studi yang melihat hubungan polimorfisme CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan kadar END dan respons terapi (*disease free survival* (DFS) dan

overall survival (OS)). Hasil studi di atas menunjukkan subjek KPD yang memiliki genotip T/T mempunyai kadar END paling rendah dan respons terapi paling pendek dibandingkan genotip lainnya (C/C dan C/T),³⁴ namun tidak ditunjukkan oleh studi Chamnanphon *et al.*³⁵ Sementara data di Indonesia belum ada. Polimorfisme CYP2D6*10 mengakibatkan bervariasinya kadar END (30–53%).^{17, 23}

Studi-studi randomisasi berskala besar seperti *the Breast International Group* (BIG) 1–98 trial,³⁶ *the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination* (ATAC) trial,³⁷ *the Austrian Breast and Colorectal Study 8* (ABCSG 8) trial,³⁸ dan *the International Tamoxifen Pharmacogenomics Consortium* (ITPC) metaanalysis³⁹ menunjukkan hasil tidak konsisten dalam hal apakah ada hubungan antara polimorfisme genetik CYP2D6 dengan respons terapi. Perbedaan hasil studi ini dapat disebabkan oleh adanya perbedaan dalam desain studi, metode *genotyping*, sumber DNA, dan jumlah sampel dari tiap studi.

De Andreas *et al.*⁴⁰ menunjukkan adanya ketidaksesuaian (*disconcordance*) antara pengukuran fenotip secara langsung (*phenotyping*) dan estimasi fenotip berdasarkan genotip. Genotip hanya menunjukkan alel potensial yang membawa dampak klinis pada respons terapi, namun tidak dapat memberikan gambaran aktivitas enzim CYP2D6 individu secara akurat. Untuk mendapatkan gambaran aktivitas metabolik CYP2D6 secara akurat perlu dilakukan *phenotyping* menggunakan *probe drug*. Dekstrometorfan 30 mg peroral dosis tunggal selama ini merupakan *probe drug* yang dipakai untuk melakukan *phenotyping* aktivitas CYP2D6.⁴¹

Tamminga *et al.*⁴² menunjukkan rasio metabolik dekstrometorfan/dekstrorfan (MR DMP/DX) plasma jam ke-3 berkorelasi kuat dan bermakna dengan kadar Z-END.⁴² Berdasarkan MR DMP/DX maka individu akan terdistribusi ke dalam 4 fenotip berdasarkan aktivitas metaboliknya yaitu *poor metabolizer* (PM), *intermediate metabolizer* (IM), *extensive metabolizer* (EM) dan *ultrarapid metabolizer* (UM). Berdasarkan hasil *phenotyping* dapat diramalkan aktivitas metabolik seseorang.

Studi yang bertujuan melihat peran genotip dalam memprediksi kadar Z-END menunjukkan sebanyak 60% subjek (termasuk 30% subjek dengan fungsi aktivitas CYP2D6 normal) mempunyai kadar Z-END di bawah 5,9 ng/mL.⁴³ Genotip hanya menjelaskan variabilitas kadar END sebesar 27%.⁴³ Hasil studi menunjukkan

pengukuran kadar Z-END plasma secara langsung saat *steady state* lebih baik digunakan sebagai landasan untuk individualisasi dosis.⁴³ Studi yang bertujuan mengevaluasi hubungan genotip dan fenotip CYP2D6 dengan kadar END plasma menunjukkan genotip dan fenotip masing-masing menjelaskan 12% dan 26% variabilitas kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state*.²⁷

Ada banyak faktor yang dapat menyebabkan bervariasinya respons terapi TAM, sehingga ingin dicari hubungan antara genotip dan fenotip CYP2D6 dengan kadar Z-END dalam plasma sebagai landasan penyesuaian dosis TAM pada penderita KPD di Indonesia.

1.2 Perumusan Masalah

- Efek antiestrogen TAM bersifat *concentration dependent*,⁴¹ sehingga diperlukan rentang kadar terapeutik bagi END dalam menimbulkan keberhasilan terapi. Hingga saat ini belum diketahui berapa banyak penderita KPD di Indonesia yang memperoleh TAM 20 mg/hari yang dapat mencapai MTC Z-END (5,9 ng/mL). Pengetahuan ini diperlukan dalam memprediksikan respons terapi jangka panjang.
- Bervariasinya respons terapi TAM antara lain disebabkan oleh adanya polimorfisme genetik enzim CYP2D6 yang aktivitasnya bervariasi luas antar individu dan etnik. Sampai saat ini belum diketahui hubungan variabel-variabel yang dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma pada penderita KPD di Indonesia. Data ini perlu diketahui untuk meramalkan efektivitas dan keamanan TAM.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menentukan hubungan genotip dan fenotip CYP2D6 dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Tujuan Utama

- Menentukan persentase penderita KPD yang mencapai MTC Z-END (5,9 ng/mL) dalam plasma dengan dosis TAM 20 mg/hari pada saat *steady state*.
- Menentukan hubungan genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
- Menentukan hubungan fenotip CYP2D6 dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.

1.3.2.2 Tujuan Tambahan

- Menentukan hubungan karakteristik demografik (usia, indeks massa tubuh, *waist/hip ratio*) dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
- Menentukan hubungan karakteristik klinis (usia saat diagnosis, status menopause, waktu minum obat TAM, ukuran tumor, jumlah nodul, metastasis, stadium KPD, ER, PgR, HER-2, Ki-67, subtipe molekular, jenis terapi, interaksi obat, kadar SGPT, rasio kadar SGPT/SGOT, *non-alcoholic fatty liver*, riwayat kemoterapi, dan *adherence*) dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
- Menentukan variabel yang berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.

1.4 Hipotesis

- Genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
- Fenotip (MR DMP/DX) berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
- Karakteristik demografik berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
- Karakteristik klinis berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.

- Fenotip merupakan variabel yang berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Akademik

Memberi sumbangan pengetahuan dalam bidang farmakologi dengan memprediksi aktivitas metabolik seseorang dengan cara membandingkan MR DMP/DX pada jam ke-3 pasca konsumsi DMP 30 mg per oral (*single point plasma phenotyping*) pada penderita KPD yang memperoleh TAM di Indonesia.

1.5.2 Kebijakan Kesehatan

Pengetahuan mengenai hubungan antara genotip dan fenotip CYP2D6 terhadap kadar Z-END diharapkan dapat menjadi data dasar untuk membuat panduan dalam melakukan individualisasi dosis TAM sehingga dapat meminimalisasi efek samping maupun kegagalan pengobatan penderita KPD di Indonesia.

1.5.3 Penelitian Lebih Lanjut

Apabila hasil studi ini dapat membuktikan adanya hubungan antara genotip dan fenotip CYP2D6 terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma diharapkan hasil studi ini dapat menjadi dasar untuk dilakukan studi lanjutan untuk melihat hubungan MTC dengan respons terapi (*disease free survival/progression free period*).

1.6 Kebaruan Penelitian

Sudah diketahui ada perbedaan karakteristik penderita KPD antar individu dan etnik dan hingga saat ini belum banyak informasi yang diketahui tentang variabel-variabel yang dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma pada populasi Indonesia. Berdasarkan hasil studi ini diharapkan kita tahu variabel mana yang paling reliabel untuk meramalkan pencapaian kadar Z-END dalam plasma sebagai patokan dalam penyesuaian dosis TAM pada penderita KPD di Indonesia untuk menghindari dosis subterapeutik dan kegagalan terapi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

2.1.1 Etiologi

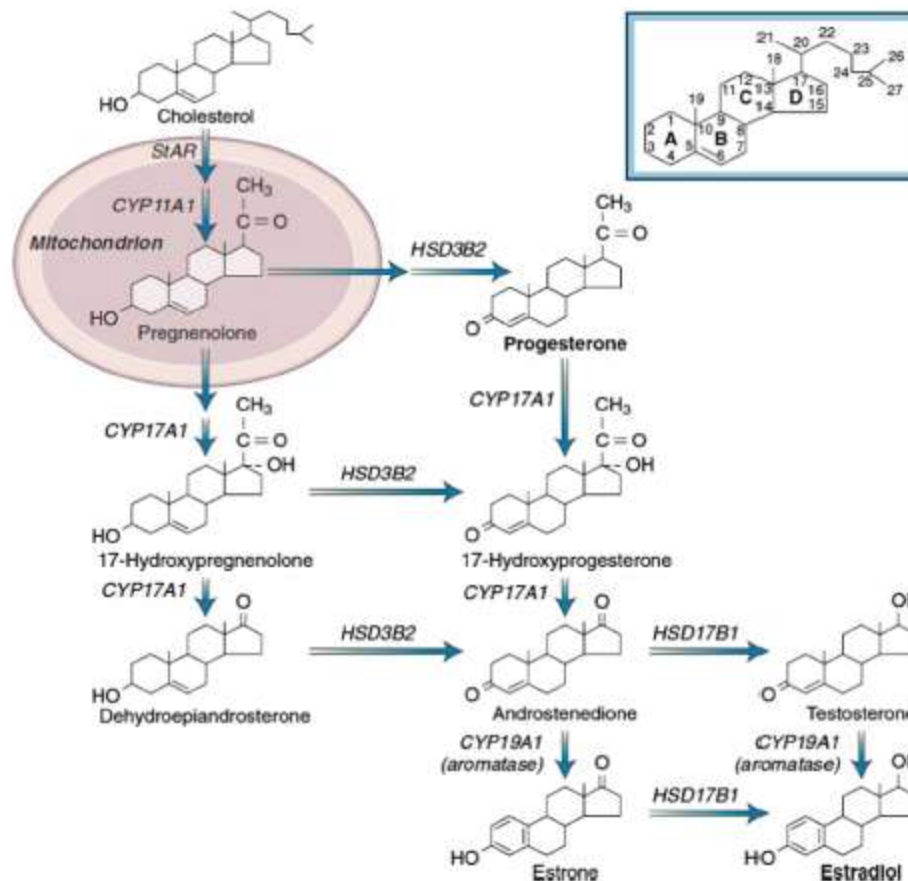
Ada beberapa faktor risiko KPD yang telah berhasil diidentifikasi sebagai penyebab KPD antara lain usia, lokasi geografi, status reproduksi (usia saat *menarche*, menopause usia tua, nulipara), penggunaan hormon eksogen (terapi hormon, kontrasepsi hormonal), gaya hidup (alkohol, makanan tinggi lemak, kurangnya aktivitas fisis), obesitas, sosial ekonomi tinggi, faktor genetik, dan lain-lain.⁴⁴ Dalam kaitannya dengan faktor genetik metaanalisis menunjukkan risiko relatif perempuan yang memiliki 1, 2, dan 3 atau lebih kerabat lini pertama menderita KPD untuk mengidap penyakit yang sama dibandingkan perempuan yang tidak mempunyai kerabat menderita KPD masing-masing sebesar 1,8, 2,9. dan 3,9.⁴⁵

Faktor genetik yang saat ini diketahui meningkatkan risiko KPD antara lain gen dengan daya penetrasi tinggi (BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, ATM, NBS1, atau LKB1), gen dengan daya penetrasi rendah seperti gen sitokrom P450 (CYP1A1, CYP2D6, CYP19), famili *glutathion S-transferase* (GSTM1, GSTP1), alkohol dan gen metabolisme karbon tunggal (ADH1C and MTHFR), gen-gen yang memperbaiki DNA (XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF), *genes encoding cell signaling molecules* (PgR, ER, TNF α or HSP70),⁴⁴ amplifikasi *epidermal growth factor reseptor* (EGFR) yang meliputi HER2, neu, atau ErbB2 meningkatkan risiko KPD sebesar 15–30% dan berkaitan dengan prognosis buruk dan berkurangnya *survival rate*.⁴⁶

2.1.2 Patogenesis

2.1.2.1 Estrogen.

Estrogen merupakan steroid C18 yang terdiri dari 1 cincin benzen, grup hidroksil-fenolik pada C3 dan sebuah grup hidroksil (17 β -estradiol) atau sebuah grup keton (estron) pada posisi C17. Estrogen utama yang ditemukan dalam sirkulasi tubuh manusia adalah estron (E1), 17 β -estradiol (E2), dan hidroksiestriol/estriol (E3).



Gambar 2.1. Jalur Sintesis Estrogen⁴⁷

Singkatan: *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR); CYP11A1, *side-chain cleavage of P450*; CYP17A1, *17-hydroxylase/17,20- lyase*; HSD3B2, *3b-hydroxysteroid dehydrogenase-D5,4 isomerase type 2*; CYP19A1, *aromatase*; HSD17B1, *17b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*

Di antara ketiga jenis estrogen, E2 merupakan estrogen dengan aktivitas biologis paling besar. E2 terutama disekresi oleh sel granulosa ovarium (terletak dekat sel teka) yang sintesisnya di bawah regulasi *follicle stimulating hormone* (FSH). Estron secara reversibel dikonversi menjadi E2 melalui kerja enzim 17 β -hidroksisteroid dehidrogenase. Androstenedion yang merupakan produk paling penting dari sel teka selama fase folikular siklus menstruasi tidak aktif secara biologis, namun berperan sebagai prekursor E1 dan testosteron di dalam ovarium dan jaringan perifer. Testosteron dikonversi menjadi E2 berdasarkan kerja enzim aromatase di dalam jaringan perifer. E1 dan E2 masing-masing disintesis dari aromatisasi androstenedion dan testosteron melalui kerja enzim aromatase (CYP19), sementara E3 disintesis dari E1 melalui perantaraan 16 α -hidroksitestosteron (**Gambar 2.1.**)^{48, 49}

Status menopause merupakan faktor yang ikut berperan dalam menentukan jenis estrogen yang dominan ditemukan dan tempat biosintesisnya. Pada perempuan pramenopause E2 merupakan estrogen yang dominan ditemukan dalam sirkulasi, dihasilkan oleh ovarium, sementara pada perempuan pascamenopause estrogen utama yang ditemukan dalam sirkulasi adalah E1 dihasilkan dari jaringan ekstrasgonad dan bekerja secara lokal pada tempat disintesisnya seperti pada sel mesenkim jaringan adiposa (termasuk yang terdapat pada payudara), osteoblas, kondrosit tulang, sel otot polos aorta, endotel vaskular, dan beberapa bagian otak.⁵⁰

2.1.2.2 Reseptor Estrogen

Reseptor estrogen merupakan faktor transkripsi yang berperan mengatur ekspresi gen pada pembelahan sel dan memegang peran penting di dalam perkembangan sel payudara.⁵¹ E2 merupakan ligan alamiah ER yang mengikat ER dengan afinitas tinggi ($K_d \sim 0,26$ nM).⁵² Efek biologis estrogen dimediasi melalui ikatan E2 dengan salah satu dari ER (ER α atau ER β). Kedua ER diekspresikan secara luas pada tubuh manusia dengan distribusi sebagai berikut: ER α banyak ditemukan dalam jaringan payudara, endometrial, ovarium, dan hipotalamus sementara ER β lebih banyak ditemukan di dalam otak, tulang, endotel, jantung, usus, ginjal, paru, dan jaringan prostat.⁵³

ER α maupun ER β disandi oleh dua gen yang terletak pada kromosom yang berbeda, yaitu pada lokus 6q25.1 (ER α) dan lokus 14q23–24 (ER β).⁵⁴ ER α dan ER β memperlihatkan fungsi yang *overlapping* namun masing-masing juga mempunyai peran unik pada mekanisme kerja *in vivo* yang tergantung pada estrogen. Kedua ER ini mempunyai aktivitas transkripsi yang berbeda pada ligan, tipe sel, dan promotor tertentu. Bila kedua ER diekspresikan bersamaan, ER β memperlihatkan efek penghambatan ekspresi gen yang dimediasi oleh ER α .⁵³

Tipe ER yang telah berhasil diketahui saat ini antara lain *wild-type* ER (ER α -66 dan ER β 1) beberapa isoform varian multipel masing-masing *wild-type* ER. Isoform ER α berasal dari pemangkasan protein atau mutasi asam amino tunggal, sementara isoform ER β berasal dari *alternative splicing* ekson yang dikoding paling akhir (ekson 8). Isoform ER α yang paling sering dirujuk adalah ER α -46 dan ER α 36,

sementara isoform ER β terdiri dari ER β 2, ER β 3, ER β 4, dan ER β 5 (tidak punya kemampuan untuk memulai aktivitas transkripsi gen dan hanya dapat membentuk heterodimer dengan ER β 1 untuk memodulasi aktivitas transkripsi gen).⁵⁵

Pada kelenjar payudara dapat ditemukan kedua jenis ER yaitu ER α dan ER β . ER α diekspresikan terbatas pada sel luminal tetapi ER β didistribusikan secara luas pada sel epitel basal dan luminal, fibroblas, sel adiposa, limfosit, dan sel endotelial.⁵⁴ Pada sel epitelial payudara ER diekspresikan dengan persentase yang berbeda yaitu ER α (< 10%), sementara ER β (70–80%). Selain pada sel epitelial payudara ER β juga diekspresikan di dalam stroma dan sel imun yang terdapat di dalam payudara.⁵⁶

Estrogen penting perannya untuk homeostasis kelenjar payudara normal.⁵⁴ Pada payudara ER α mempunyai peran penting pada pertumbuhan dan proliferasi kelenjar payudara.⁵⁷ Aktivasi ER α oleh estrogen berlebihan akan menginduksi pembelahan sel dan menstimulasi pertumbuhan sel sehingga menyebabkan pemulaan dan perkembangan kanker. Evaluasi keberadaan ekspresi ER α di dalam spesimen KPD penting untuk pemilihan terapi, namun respons individu terhadap terapi hormon tidak dapat secara tepat diprediksi berdasarkan status ER α saja.⁵⁴

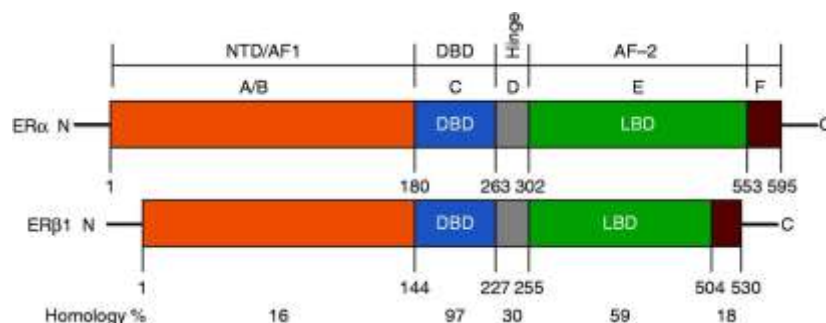
ER β dapat mengurangi pertumbuhan tumor payudara dengan menurunkan ekspresi *vascular endothelial growth factor* dan *platelet-derived growth factor* β yang akan menyebabkan perlambatan transisi pembelahan sel ke fase-S.⁵⁴ Pada sel kultur *michigan cancer foundation-7* (MCF-7). ER β memperlihatkan kerja anti-proliferatif dengan merepresi transkripsi gen *c-myc*, *cyclin D1*, dan *cyclin A*, dan meningkatkan ekspresi p21 (Cip1) dan p27 (Kip) yang akan menyebabkan penghentian pembelahan sel KPD pada fase G(2).⁵⁸ ER β dapat berinteraksi dengan atau menghambat ER α secara langsung maupun tidak langsung, menyupresi pertumbuhan sel, dan memengaruhi responsivitas terhadap terapi hormon.⁵²

2.1.2.3 Reseptor Estrogen sebagai Reseptor Nukleus

Kedua ER merupakan anggota superfamili reseptor nukleus yang terdiri dari 48 faktor transkripsi pada manusia.⁵² Secara struktural, kedua sub tipe ER memiliki arsitektur yang sama terdiri dari enam regio (A–F). Terbentang dari gugus amin

(NH₂-) hingga karboksi (COO-) terminal. Terdapat tiga domain fungsional yaitu *N-terminal domain* (NTD), *DNA-binding domain* (DBD), dan *ligand-binding domain* (LBD). *Aktivator function* (AF) berperan dalam regulasi aktivitas transkripsi ER. Pada NTD terdapat regio A/B yang mengandung AF-1 yang aktivasinya independen terhadap hormon. Regio C-terminal (di dalam DBD domain) memodulasi transkripsi gen dengan cara spesifik ligan dan memengaruhi dimerisasi ER. DBD tempat berikatan dengan sekuen DNA spesifik yang disebut sebagai *estrogen response elements* (ERE) terletak dekat regio promotor atau *enhancer* dan mempunyai peran di dalam memodulasi rekrutmen koaktivator. Di antara DBD dan LBD terletak regio D (“hinge domain”) yang berperan di dalam modulasi ikatan DNA untuk beberapa reseptor. Pada LBD terdapat *hormone binding pocket* yaitu tempat terjadinya interaksi dengan koregulator, dan penghubung homo- atau heterodimerisasi. Regio E meliputi LBD mengandung AF-2 yang aktivasinya dependen terhadap hormon. Regio paling akhir adalah regio F hanya ditemukan pada beberapa reseptor dan masih belum jelas fungsinya. **(Gambar 2.2).**^{52, 55}

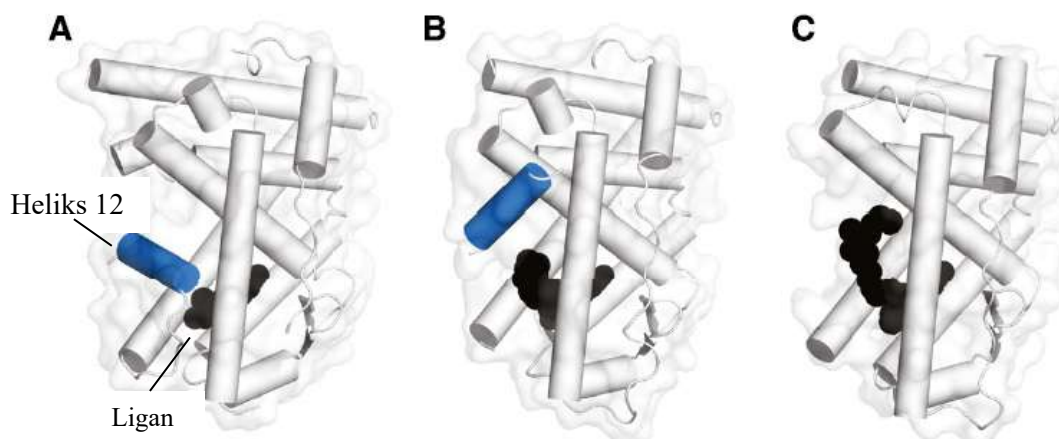
Protein ER α terdiri dari 595 asam amino sementara ER- β yterdiri dari 530 asam amino. *Wild-type receptor* ER (ER α -66 dan ER β 1) memiliki kesamaan jumlah penyusun asam amino pada DBD (96%), LBD (58%) menunjukkan ER β dapat berikatan dengan target gen yang sama dengan ER α tetapi keduanya mempunyai ligan spesifik yang berbeda.⁵⁴ Regio NTD ER β lebih pendek dari ER α (kesamaan asam amino 15%). Selain adanya perbedaan nyata dari regio NTD, kedua ER berbeda dalam komposisi *hinge region* dan C-terminal domain **(Gambar 2.2).**⁵⁹



Gambar 2.2. Struktur Reseptor Estrogen⁵⁹

Domain struktural reseptor nukleus diberi label A-F, dengan jumlah asam amino penyusun tiap domain ditunjukkan di bawahnya. Posisi relatif domain fungsional yang diketahui direpresentasikan dalam bentuk batang solid. Persentase asam amino homolog antara ER- α dan ER- β juga ditunjukkan. Regio A/B berhubungan dengan N-terminal domain mengandung domain *activation fuction-1* (AF1) dengan fungsi independen ligan dan domain koregulator yang bertanggungjawab untuk rekrutmen koaktivator dan korepresor. Regio C berhubungan dengan DNA-binding domain (DBD), yang diperlukan untuk berikatan dengan *estrogen response elements* (ERE) spesifik di dalam regio promotor proksimal atau pada distal elemen regulator gen yang responsif terhadap estrogen. Regio E karboksi-terminal dan F berhubungan dengan *ligand binding domain* (LBD) mengandung *activation fuction-2* (AF-2) yang mempunyai fungsi transaktivasi dependen ligan. Regio ini juga berfungsi untuk berikatan dengan protein ko-regulator dan *chaperone*, demikian juga untuk dimerisasi reseptor dan translokasi nukleus. Regio D mengandung beberapa domain fungsional, termasuk *hinge domain*, bagian dari *ligand-dependent activating domain* dan signal lokalisasi nukleus.

Pada kebanyakan reseptor terikatnya agonis (ligan sintetis berukuran kecil yang meniru kerja ligan endogen) pada LBD menghasilkan perubahan konformasi yang mengakibatkan rekrutmen protein koaktivator yang akan meningkatkan transkripsi gen target. Obat yang berkerja sebagai antagonis (ligan sintetis yang menghambat kerja ligan endogen) saat terikat dengan LBD akan mencegah perubahan konformasi yang ditimbulkan oleh agonis sehingga mencegah rekrutmen koaktivator dan stimulasi proses transkripsi. Bila agonis parsial berikatan dengan LBD akan menyebabkan perubahan konformasi yang hanya menyebabkan aktivasi parsial proses transkripsi karena kurang lengkapnya rekrutmen koaktivator. Agonis parsial akan berkompetisi dengan agonis penuh dan mengurangi kadar intrinsik transaktivasi pada agonis penuh.⁵²



17 β -estradiol
Konformasi agonis

Raloxifen
konformasi antagonis

Fluvestrant (IC182,780)
konformasi antagonis murni

**Gambar 2.3. Konformasi Heliks 12 terhadap Agonis dan Antagonis pada
Ligand Binding Domain Reseptor Estrogen⁵²**

Pada gambar ini heliks 12 berwarna biru dan ligan berwarna hitam. Struktur LBD dari ER menunjukkan ciri-ciri struktural berkontribusi terhadap sifat agonis dan antagonis yang diinduksi oleh ligan. A). Agonis alamiah (17 β -estradiol), mengaitkan diri dalam LBP dan menempatkan heliks 12 pada konformasi sebagai agonis atau konformasi aktif. Konformasi ini membentuk *coactivator-binding surface* seperti yang dideskripsikan pada Gambar 2.3.B. Sebaliknya, ketika raloxifen terikat di dalam LBP helix 12 akan berotasi terhadap konformasi agonis sehingga dia berikatan di dalam AF-2 *coactivator-binding surface* dan menghambat ikatan koaktivator via motif LXXLL. Konformasi ini menyebabkan timbulnya sifat antagonis, atau konformasi represif/inaktif. C). Ligan lain seperti fluvestrant dapat menghambat AF-2 *coactivator-binding surface* dan tidak menstabilkan heliks 12, ligan ini disebut sebagai antagonis murni.

Posisi heliks 12 (H12) yang dihasilkan sebagai respons terhadap terikatnya ligan merupakan penentu penting fungsi ligan apakah sebagai agonis maupun antagonis (Gambar 2.3.).⁵²

2.1.2.4 Aktivasi Reseptor Estrogen pada Kanker Payudara

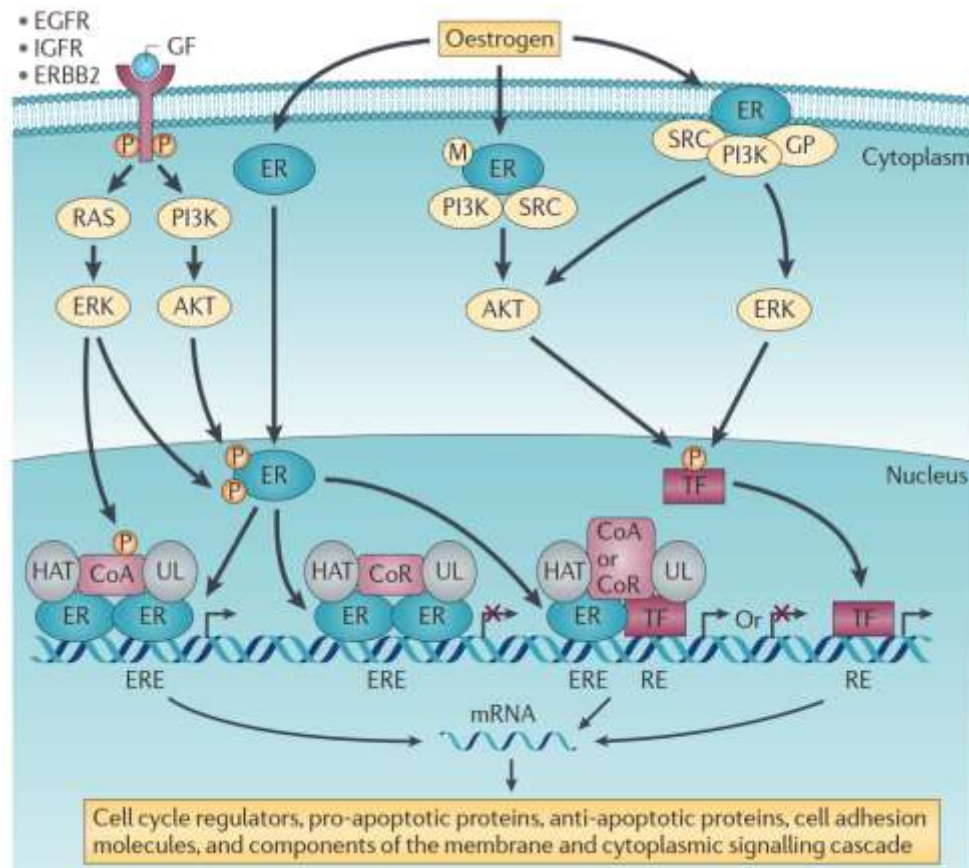
KPD merupakan *hormone-dependent cancer* karena estrogen terlibat dalam pertumbuhan dan perkembangannya.⁵⁴ Salah satu fungsi estrogen adalah dalam regulasi faktor transkripsi yang berperan dalam pertumbuhan dan diferensiasi payudara, namun bila proliferasi sel yang dimediasi oleh ER terjadi berlebihan maka akan menginduksi timbulnya KPD.⁵¹

Pada sel KPD, sinyal yang diberikan estrogen di dalam sel kanker akan menginduksi sintesis estrogen lebih banyak untuk memenuhi kebutuhan tumor dengan cara meregulasi enzim-enzim penting yang berperan dalam biosintesis estrogen. Melalui kerja non-transkripsi yang berlangsung cepat, E2 menstimulasi fosforilasi enzim aromatase di dalam sel KPD sehingga meningkatkan aktivitas enzim tersebut. E2 juga meningkatkan aktivitas transkripsi hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenase (HSD17B), enzim yang berperan mengubah E1 menjadi E2. Efek ER α dalam menstimulasi faktor transkripsi gen untuk memulai proliferasi sel-sel KPD tergantung pada sintesis lokal E2, sementara ER β memperlihatkan efek yang berlawanan pada proliferasi sel KPD.⁶⁰

Aktivasi ER terjadi dengan dua mekanisme yaitu tergantung dari keberadaan ligan (*ligand-dependent activation of ER*) dan tanpa keberadaan ligan (*ligand-*

independent activation of ER). Pada mekanisme aktivasi jalur klasik ER (*ligand-dependent activation of ER*), ER- α terletak di dalam sitoplasma dalam kondisi inaktif dalam bentuk kompleks dengan *heat-shock protein* (Hsp) 50, 70, dan 90 yang akan menstabilisasi ER. Pada saat *ligand-binding pocket* ditempati oleh ligannya maka Hsp akan mengalami disosiasi ER dan DBD reseptor akan terbuka. Saat berikatan dengan DNA, reseptor merekrut p160 famili ko-regulator seperti *steroid receptor coactivator* (SRC). Struktur ligan yang memasuki *ligand-binding pocket* dan memengaruhi konformasi reseptor maupun koaktivator dan korepresor yang direkrut.⁶¹

ER juga dapat diaktivasi oleh mekanisme *ligand-independent* via *cross-talk* dengan jalur penyinal lainnya. Kedua ER dapat diaktivasi via fosforilasi oleh MAPK dan fosfatidilinositid 3-kinase (PI3K), lebih jauh lagi *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan *insulin-like growth factor receptor* (IGFR) pada saat diaktivasi oleh ligan peptida yang asalnya sama dapat mengaktivasi serin/treonin kinase (ERK dan Akt) yang kemudian akan mengatalisasi fosforilasi dan aktivasi ER. Aktivasi ER- α oleh kinase dianggap memainkan peran penting pada terjadinya kanker panyudara (**Gambar 2.4.**).⁶¹



Gambar 2.4. Mekanisme Aktivasi Reseptor Estrogen⁶¹

Ligan (estradiol/E2) berikatan dengan ER dan kompleks ligan-ER mengalami dimerisasi dan berikatan dengan DNA pada sekuen elemen respons spesifik yang dikenal sebagai estrogen respons elemen (ERE). Pada tempat ini, ER berinteraksi dengan kompleks multiprotein koaktivator (CoA) atau korepresor (CoR) untuk mengaktifkan atau merepresi transkripsi gen. Inti kompleks multiprotein ini adalah koaktivator atau korepresor aktif terfosforilasi (P) yang merekrut protein koregulator seperti histon asetiltransferase (HAT) dan ubiquitinase ligase (UL). ER secara alternatif dapat mengatur ekspresi gen dengan berinteraksi dengan faktor transkripsi binding DNA direk lainnya (TF). Berdasarkan mekanisme kerja ini, ER dapat berikatan dengan motif ERE yang berada dekat elemen respons (RE) faktor transkripsi yang berinteraksi atau secara tidak langsung berinteraksi dengan kromotin dengan cara menambatkan diri pada partner faktor transkripsi. Estrogen yang berikatan dengan ER berlokasi dalam sitoplasma (ER α dapat mengalami metilasi (M) atau pada membran sel dapat berinteraksi dengan SRC, PI3K dan protein G (GP) dan memediasi sinyal non-genomik. Hasil akhir sinyal ini melalui aktivasi kaskade protein kinase menghasilkan fosforilasi dan aktivasi TF target. TF sendiri dapat mengatur transkripsi melalui RE *site*. *Growth factor receptors*, seperti *epidermal growth factor receptor* (EGFR), termasuk ERBB2 (yang juga diketahui sebagai HER2 dan neu) dan *insulin-like growth factor receptor* (IGFR) sebagai respons terhadap *growth factor* (GR) dapat mengaktifkan ERK dan AKT serin/treonin kinase, yang kemudian dapat memfosforilasi dan mengaktifkan ER dengan cara independen ligan.

2.1.3 Klasifikasi Kanker Payudara

Hingga saat ini ada banyak klasifikasi KPD yang dikenal antara lain berdasarkan *the American Joint Committee on Cancer*, histologi, molekular, dan *the St Gallen*.

2.1.3.1 Klasifikasi KPD menurut *the American Joint Committee on Cancer*.

Klasifikasi KPD menurut stadium berdasarkan *the American Joint Committee on Cancer Staging of Breast* (AJCC)⁶² dibuat berdasarkan besar tumor primer (T), keterlibatan kelenjar getah bening regional (N), ada atau tidaknya metastasis jauh (M) (Tabel 2.1.).

Tabel 2.1. Stadium Kanker Payudara Berdasarkan Klasifikasi *the American Joint Committee on Cancer* 2010

Stadium	Tumor (T)	KGB regional (N)	Metastasis (M)
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0-T1	N1mi	M0
IIA	T0-T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0-T2	N2	M0
	T3	N1-N2	M0
IIIB	T4	N0-N2	M0
IIIC	Setiap T	N3	M0
IV	Setiap T	Setiap N	M1

Sumber: Edge *et al.*⁶²

Tumor primer (T)

Klasifikasikan tumor primer sama untuk klasifikasi klinis maupun patologi. Bila pengukuran dibuat berdasarkan pemeriksaan fisis, maka digunakan *major heading* (T1, T2, dan T3), namun apabila pengukuran menggunakan mamografi atau patologi digunakan subset *major heading*. Tumor harus diukur dalam satuan terdekat dengan 0,1 cm. Klasifikasi tumor primer menurut AJCC adalah sebagai berikut :

- Tx : tumor primer tidak dapat dinilai
- T0 : tidak ada bukti tumor primer
- Tis : karsinoma *in situ*
- Tis (DCIS) : duktal karsinoma *in situ*
- Tis (LCIS) : lobular karsinoma *in situ*
- Tis (Paget's) : *Paget's disease* pada puting payudara tanpa tumor

Catatan :

Paget's disease yang berhubungan dengan tumor diklasifikasikan berdasarkan ukuran tumor, tumor ≤ 2 cm pada dimensi terbesar.

T1	: tumor ≤ 2 cm pada dimensi terbesar
T1 mic	: mikroinvasi tumor $\leq 0,1$ cm pada dimensi terbesar
T1a	: tumor $> 0,1$ cm tetapi $\leq 0,5$ cm pada dimensi terbesar
T1b	: tumor $> 0,5$ cm tetapi ≤ 1 cm pada dimensi terbesar
T1c	: tumor > 1 cm tetapi ≤ 2 cm pada dimensi terbesar
T2	: tumor > 2 cm tetapi ≤ 5 cm pada dimensi terbesar
T3	: tumor > 5 cm pada dimensi terbesar
T4	: tumor berukuran apapun dengan ekstensi langsung ke dinding dada dan/atau ke kulit (ulserasi/nodul kulit)
T4a	: ekstensi ke dinding dada tidak termasuk otot pektoralis
T4b	: Edema (termasuk <i>peau d'orange</i>) atau ulserasi kulit payudara, dan/atau nodul kulit satelit dan/atau pada payudara yang sama.
T4c	: gabungan T4a dan T4b
T4d	: <i>inflammatory carcinoma</i>

Kelenjar Getah Bening Regional (N)

Klasifikasi kelenjar getah bening regional dibuat berdasarkan klasifikasi klinis dan patologis.

Klasifikasi KGB regional berdasarkan klinis :

Nx	: KGB regional tidak dapat dinilai (misalnya sudah diangkat)
N0	: tidak ada metastasis KGB regional
N1	: metastasis pada KGB aksila ipsilateral yang masih dapat digerakkan
N2	: Metastasis pada KGB aksila ipsilateral yang terfiksir satu sama lain (<i>matted</i>), atau KGB mamaria interna yang terdeteksi secara klinis* jika tidak terdapat metastasis KGB aksila secara klinis
N2a	: metastasis 4–9 KGB aksila (paling tidak 1 tumor berukuran > 2 mm)
N2b	: metastasis terdeteksi secara klinis pada KGB mamaria interna tanpa adanya metastasis ke KGB aksila

- N3 : metastasis pada KGB infraklavikula ipsilateral dengan atau tanpa keterlibatan KGB aksila, atau pada KGB mamaria interna yang terdeteksi secara klinis* dan jika terdapat metastasis KGB aksila secara klinis; atau metastasis pada KGB supraklavikula ipsilateral dengan atau tanpa keterlibatan KGB aksila atau mamaria interna.
- N3a : metastasis pada KGB infraklavikula ipsilateral
- N3b : metastasis pada KGB mamaria interna ipsilateral dan KGB aksila.
- N3c : Metastasis pada KGB supraklavikula ipsilateral

Catatan : * terdeteksi secara klinis maksudnya terdeteksi pada pemeriksaan pencitraan (tidak termasuk *lymphoscintigraphy*) atau pada pemeriksaan fisis atau terlihat jelas pada pemeriksaan patologis.

Klasifikasi KGB regional berdasarkan patologi

- pN0 : tidak ada metastasis KGB regional yang teridentifikasi secara histologis
- pN1mi : mikrometastasis > 0,2 mm tetapi < 2 mm
- pN1a : metastasis 1–3 KGB aksila, paling tidak 1 metastasis berukuran > 2 mm
- pN1b : Metastasis pada KGB mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis yang terdeteksi melalui SLNB tetapi tidak terlihat secara klinis
- pN1c : metastasis 1–3 KGB aksila dan KGB mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis yang terdeteksi melalui SLNB tetapi tidak terdeteksi secara klinis
- pN2 : metastasis 4–9 KGB, atau secara klinis terdeteksi pada KGB mamaria interna tanpa adanya metastasis pada KGB aksila
- pN2a : metastasis 4–9 KGB aksila (paling tidak 1 tumor berukuran > 2 mm)
- pN2b : metastasis terdeteksi secara klinis pada KGB mamaria interna tanpa metastasis ke KGB aksila
- pN3 : metastasis ≥ 10 KGB aksila, atau infraklavikula, atau terdeteksi secara klinis pada KGB mamaria interna ipsilateral

dengan keberadaan 1 atau lebih KGB aksila positif, atau lebih dari 3 KGB aksila dan KGB mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis terdeteksi dengan SLNB namun tidak terdeteksi secara klinis, atau metastatis KGB supraklavikula ipsilateral

- pN3a : metastasis ≥ 10 KGB aksila (paling tidak 12 tumor berukuran > 2 mm), atau metastasis ke KGB infraklavikula
- pN3b : metastatis terdeteksi secara klinis pada KGB mamaria interna ipsilateral dengan keberadaan 1 atau lebih KGB aksila positif, atau lebih dari 3 KGB aksila dan KGB mamaria interna dengan mikrometastasis atau makrometastasis terdeteksi dengan SLNB namun tidak terdeteksi secara klinis.
- pN3c : metastatis KGB supraklavikula ipsilateral

Metastasis jauh (M)

Klasifikasi metastasis jauh dibuat berdasarkan pemeriksaan klinis dan pencitraan.

Klasifikasi metastasis jauh menurut AJCC adalah sebagai berikut :

- Mx : metastasis jauh tidak dapat dinilai
- M0 : tidak ada metastasis jauh
- M1 : terdapat metastasis jauh

2.1.3.2 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut Histologi

Berdasarkan histologi KPD dikategorikan ke dalam dua golongan besar yaitu karsinoma in situ dan karsinoma invasif (infiltrasi). Karsinoma in situ disubklasifikasikan menjadi karsinoma duktal in situ (DCIS) atau karsinoma lobular in situ (LCIS). DCIS lebih sering ditemukan dibandingkan LCIS dan mempunyai variasi histologi yang besar terbagi menjadi komedo, kribiform, mikropapilare, papilare, dan solid, sementara LCIS mempunyai variasi histologi yang rendah.⁶³

Sama halnya dengan karsinoma in situ, karsinoma infiltrasi terdiri dari kelompok tumor dengan variasi histologi yang besar antara lain karsinoma duktal infiltrasi (IDC), lobular invasif, duktal/lobular, musinous (koloid), tubular, medulare dan

papilare. Dari semua karsinoma infiltrasi, IDC merupakan subtype yang paling sering ditemukan (70–80%).⁶³

Dalam kaitannya dengan tatalaksana, penentuan biomarker molekular (ER, PgR, dan HER2/neu) diperlukan pada IDC untuk menentukan respons penderita terhadap terapi yang diberikan (misalnya TAM atau inhibitor aromatase; AI) pada penderita dengan ER+/PR+ dan trastuzumab/lapatinib untuk penderita dengan HER/neu+), sebaliknya pada DCIS penentuan biomarker molekular masih menjadi perdebatan.⁶³

2.1.3.3 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut Molekular

Klasifikasi molekular KPD dibuat berdasarkan subtype molekular intrinsik KPD yang diidentifikasi melalui analisis *microarray* DNA tumor penderita terdiri dari : (a). Luminal A ($\pm$ 40%) bila ER+, HER2 -, protein Ki-67 rendah, dan PR tinggi, (b).Luminal B ($\pm$ 20%) bila ER+, HER2+/-, dan salah satu protein Ki-67 tinggi, dan PR rendah; (c).*Basal-like breast cancer* (15–20%) umumnya berkurangnya ekspresi target molekular yang berperan dalam timbulnya respons terapi; (d).*Triple-negative breast cancer* (TNBC) bila ER-, PR-, HER2-. TNBC banyak ditemukan pada KPD dengan ekspresi BRCA1 dan pada tipe histologi tertentu seperti karsinoma medulare dan karsinoma *cystic* adenoid; (e).HER2+/ERBB2 (10–15%) bila HER2+, ER-; (f).*Claudin low* (12–14%) merupakan kelas yang baru ditemukan seringkali *triple negative*, yang membedakan adalah rendahnya ekspresi protein sel-sel *junction* termasuk *E-cadherin*.^{63, 64}

2.1.3.4 Klasifikasi Kanker Payudara Menurut *the St Gallen International*

Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer.

*The St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer.*⁹ mengadopsi penggunaan klasifikasi subtype molekular intrinsik dalam aplikasi praktis menggunakan patokan ER, PR, HER2, dan ki-67 (marker proliferasi sel). Karena tidak selalu memungkinkan memperoleh gen untuk melakukan pemeriksaan DNA, maka *guideline* tersebut di atas menggunakan kriteria klinikopatologi yang mirip namun tidak identik dengan subtype molekular intrinsik (Tabel 2.2.).

Tabel 2.2 Subtipe Molekular Intrinsik dan Klinikopatologi Kanker Payudara⁹

Subtipe molekular	Klinikopatologi	Keterangan
Luminal A	Luminal A-like	ER+, PR+, HER2-, Ki-67 rendah
Luminal B	Luminal B-like (HER2-)	ER+, HER2- dan paling tidak salah satu dari Ki-67 tinggi, PR-/rendah
	Luminal B-like (HER2+)	ER+, <i>overexpression</i> /amplifikasi HER2, apapun Ki-67, apapun PR
Erb-B2 <i>overexpression</i>	HER2+ (non-luminal)	<i>Overexpression</i> /amplifikasi HER2 tanpa keberadaan ER dan PR
<i>Basal-like</i>	<i>Triple negative (ductal)</i>	Tanpa keberadaan ER, PR, dan HER2-

Ki-67 tinggi bila $\geq 20\%$.

Sumber: Goldhirsch *et al.*⁹

2.1.4 Diagnosis

Pendekatan diagnosis KPD meliputi anamnesis keluhan dan pemeriksaan klinis (palpasi bimanual payudara, kelenjar limfe lokoregional, dan penilaian adanya metastasis), disertai dengan pemeriksaan penunjang untuk menegakkan diagnosis yang meliputi pencitraan (mamografi, ultrasonografi, dan *magnetic resonance imaging*/MRI), dan pemeriksaan patologi yang dilakukan dua kali sebelum dan sesudah operasi.⁶⁵

2.1.5 Tatalaksana

Tatalaksana utama KPD meliputi pembedahan, terapi radiasi (RT), terapi endokrin/hormonal (ET), dan terapi target. Tatalaksana pembedahan biasanya digunakan pada KPD terlokalisasi diikuti dengan terapi adjuvan untuk memastikan pemulihan penuh dan meminimalkan risiko metastasis. RT adalah proses saat sel-sel KPD dipajankan dengan radiasi tingkat tinggi secara langsung digunakan untuk membunuh sel-sel kanker yang tidak terlihat pada saat pembedahan bertujuan untuk mengurangi risiko kambuhan lokal. Pemberian RT dalam kombinasi dengan kemoterapi (ChT) pasca bedah akan menyusutkan KPD.⁶²

Pemilihan terapi sistemik adjuvan harus dimulai 2–6 minggu pasca bedah dan dipilih berdasarkan: (a). Prediksi sensitivitas terhadap tipe terapi tertentu dan

manfaat penggunaannya, (b). Risiko kekambuhan individual. Keputusan akhir dalam pemilihan terapi sistemik adjuvan harus menggabungkan prediksi *treatment sequelae*, usia, status kesehatan umum, komorbid, dan preferensi penderita.¹¹

2.1.5.1 Terapi Hormon

Terapi hormonal merupakan terapi sistemik KPD yang ditujukan pada sel kanker yang memiliki reseptor hormon positif. Definisi reseptor hormon positif adalah ER dan/PR positif > 1% dengan pewarnaan imunohistokimia. Status menopause penderita KPD harus dipertimbangkan dalam memilih terapi hormon (premenopause atau pascamenopause).¹²

Secara umum penetapan status menopause dibagi sebagai berikut: a) Premenopause adalah kelompok yang masih menstruasi secara teratur tanpa menggunakan kontrasepsi oral atau terapi hormon.; b) Pascamenopause bila memenuhi salah satu di bawah ini umur lebih dari 60 tahun, telah dilakukan *bilateral oophorectomy*, perempuan umur kurang dari 60 tahun dan tidak menggunakan kontrasepsi oral atau terapi hormon dengan diketahui mempunyai uterus yang intak dan tidak menstruasi paling sedikit 1 tahun sebelum terdiagnosis KPD; c) *Uncertain* (perimenopause) adalah kelompok yang tidak memenuhi kriteria di atas.³

Bila status menopause tidak jelas maka penentuan pascamenopause adalah sebagai berikut: amenorea lebih dari 12 bulan tanpa penggunaan alat kontrasepsi atau pengaruh obat-obatan, *bilateral oophorectomy*, usia lebih dari 55 tahun, kastrasi radiasi/amenorea lebih dari 3 bulan, menggunakan terapi hormon pada usia ≥ 35 tahun. Bila kriteria di atas tidak terpenuhi maka status menopause ditentukan dengan pengukuran *follicle stimulating hormone* dan estradiol minimal 4 minggu setelah berhenti menggunakan terapi hormon atau kontrasepsi oral.¹²

2.1.5.1.1 Jenis Terapi Hormon

Ovarium merupakan sumber estrogen pada perempuan premenopause. Saat ini ada jenis terapi yang bertujuan mengurangi estrogen yaitu ablasi dan kompetitif. Pada terapi ablasi hambatan fungsi ovarium permanen bila dilakukan bilateral salpingo-ooforektomi, radioablasi (radioterapi pada daerah ovarium), dan tidak permanen dengan medikamentosa. Bila menggunakan medikamentosa maka terapi hormon dianjurkan selama 5 tahun.¹²

Prinsip terapi hormon menggunakan medikamentosa adalah i). Menekan produksi hormon estrogen oleh ovarium (analog *luteinizing hormone releasing hormone* diberikan pada perempuan menopause. Contoh: goserelin, leuprolid; ii). Menekan produksi hormon estrogen perifer (aromatase inhibitor) diberikan pada perempuan pascamenopause. Contoh: anastrozol, letrozol, dan *exemestan*; iii). *Down regulation reseptor estrogen (selective estrogen receptor down-regulator)* diberikan pada perempuan pascamenopause. Contoh: fulvestrant.

Prinsip terapi hormon secara kompetitif yaitu memblokir atau mendahului berikatan dengan reseptor hormon secara selektif dengan menggunakan *selective estrogen receptor modulator* (SERM) sehingga estrogen tidak dapat berikatan dengan reseptor hormon. Diberikan pada penderita pramenopause dan pascamenopause. Contoh: tamoksifen.¹²

2.1.5.1.2 Indikasi Terapi Hormon

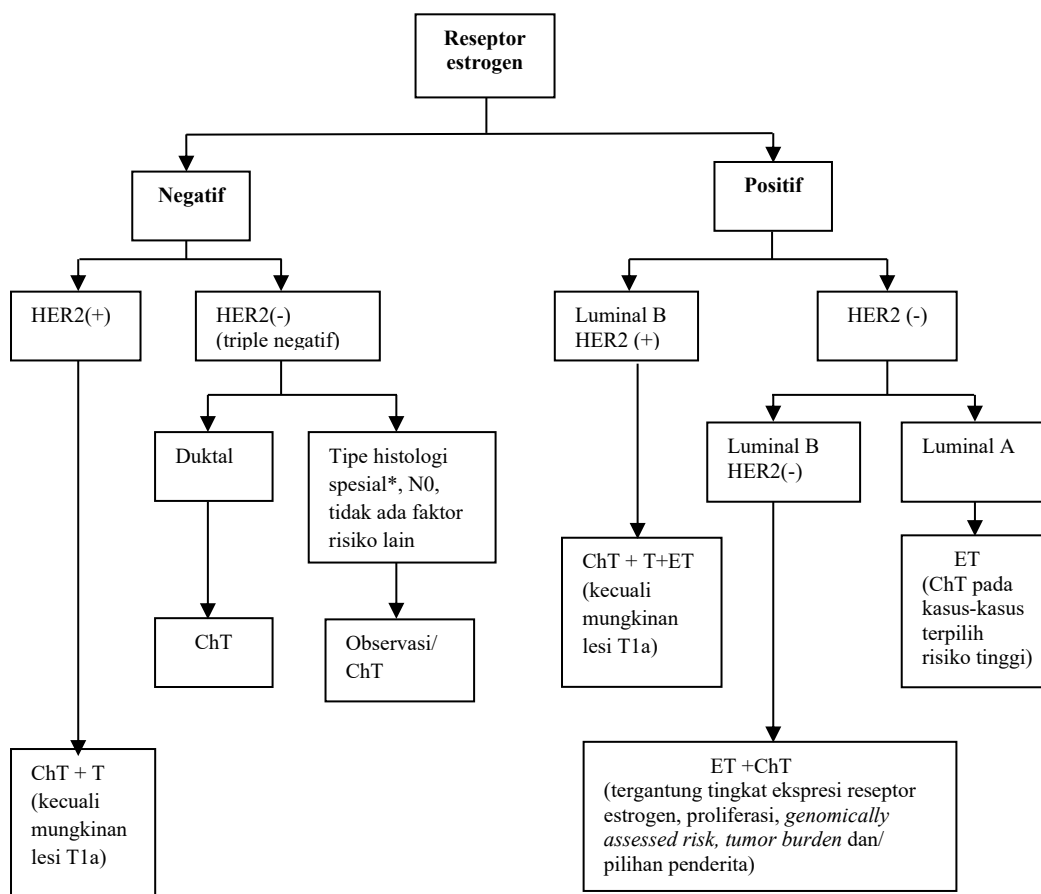
Ada berapa indikasi hormon yang sudah diketahui antara lain: (a). Terapi adjuvan pada KPD dini baik monoterapi/kombinasi dengan kemoterapi pada KPD stadium awal baik dengan KGB positif maupun negatif; (b). Terapi primer pada KPD dengan metastasis jauh; (c). Terapi neoadjuvan (terapi hormon preoperatif) untuk mengecilkan ukuran tumor dan KGB dalam usaha untuk mengubah penyakit *non-operable* menjadi *operable* atau mengurangi radikalitas operasi; (d). *Chemoprevention* adalah pemberian obat-obat hormon sebagai salah satu strategi untuk mencegah KPD pada populasi normal dengan risiko tinggi mutasi pada BRCA2. Obat yang biasa diberikan adalah golongan tamoksifen. Berbeda dengan poin a, b, c yang syaratnya adalah ER/ dan PR positif, maka pada *chemoprevention* tidak harus memiliki ER dan PR positif.¹²

2.1.5.3 Tatalaksana Kanker Payudara Menurut Beberapa Guideline

The St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013⁹ dan 2015¹¹ menyatakan pemilihan terapi adjuvan sistemik harus berdasarkan panduan fenotip intrinsik yang ditentukan berdasarkan ER/PR, HER2, dan Ki-67 bila memungkinkan. Bagi tipe histologi tertentu ET diberikan pada

histologi yang responsif (kribriiform, tubular, dan musinous), sementara ChT bagi non-responsif endokrin (apokrin, medular, sistik adenoid, dan metaplastik).^{9, 11}

Mengacu pada *the St Gallen, the Eropean Society for Medical Oncology (ESMO) clinical practical guideline*⁶⁶ merekomendasikan pemilihan ajuvan terapi sistemik menggunakan panduan ekspresi biomarker dan fenotip intrinsik dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5. Pemilihan Terapi Ajuvan Sistemik Berdasarkan Ekspresi Biomarker dan Fenotip Intrinsik.⁶⁵

ER=reseptor estrogen, HER-2=reseptor human epidermal growth factor-2, ChT=kemoterapi, ET=terapi endokrin, T=trastuzumab.

Semua kanker luminal harus diterapi dengan terapi hormon (ET). KPD luminal A tidak memerlukan kemoterapi, kecuali dengan risiko tinggi kekambuhan (*extensive nodal involvement*). Luminal B, HER-2 negatif pada umumnya diberikan ET dan ChT. Indikasi ChT tergantung dari risiko kekambuhan individual (*grade*,

proliferasi, dan invasi vaskular). Luminal B, HER-2 positif ET, ChT, dan trastuzumab (anti-HER-2). HER-2 positif (non-luminal) diberikan ChT+ antiHER-2. *Triple negative (ductal)* diberikan ChT.⁶⁵

Pada penderita pramenopause, TAM 20 mg/hari selama 5–10 tahun merupakan standar terapi. Bila penderita menjadi pascamenopause dalam 5 tahun pertama selama terapi TAM, tatalaksana ditukar dengan letrozole/AI. Bila penderita KPD mempunyai kontraindikasi dengan TAM, agonis *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) dalam kombinasi dengan AI harus digunakan, namun bila ada kontraindikasi pada kedua obat maka agonis GnRH saja dapat digunakan.⁶⁵

The St Gallen guideline 2015¹¹ merekomendasikan pada penderita yang responsif endokrin dengan risiko rendah dapat diberikan TAM selama 5 tahun, sementara pada penderita dengan risiko tinggi relaps (status masih pramenopause pasca komoterapi, keterlibatan 3–4 KGB aksila, usia ≤ 35 tahun) dapat dipertimbangkan pemberian *ovarian fuction suppression* (OFS) dengan TAM atau *exemestane*. Pada penderita risiko tinggi yang telah menyelesaikan terapi TAM selama 5 tahun, direkomendasikan perpanjangan lama terapi menjadi total 10 tahun dengan TAM atau AI (pada yang sudah pascamenopause).

*ASCO guideline*⁶⁶ merekomendasikan pemberian TAM 5 tahun pada penderita pramenopause dengan reseptor hormon positif. Jika perempuan pra- atau perimenopause dan sudah memperoleh TAM 5 tahun, ditawarkan perpanjangan terapi menjadi 10 tahun.

Pada penderita pascamenopause, AI (non-steroid dan steroid) dan TAM merupakan pilihan utama. *The St Gallen guideline* 2015¹¹ merekomendasikan penggunaan TAM saja pada penderita dengan risiko rendah, sementara pada penderita dengan risiko tinggi digunakan AI. *ASCO guideline*⁶⁶ merekomendasikan minimum lama terapi 5 tahun terapi adjuvan dengan inhibitor aromatase atau TAM diikuti dengan inhibitor aromatase (berurutan). Jika perempuan pascamenopause dan sudah memperoleh TAM 5 tahun, ditawarkan untuk meneruskan TAM atau ditukar dengan AI dengan total lama terapi 10 tahun.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline¹⁰ merekomendasikan terapi hormon berdasarkan status menopause. Bila penderita pada saat didiagnosis

KPD mempunyai status pramenopause maka dapat diberikan beberapa alternatif: dapat diberikan (a). TAM selama 5 tahun $\pm$ supresi ovarium atau ablasi. Bila perempuan menjadi menopause setelah 5 tahun dapat dilanjutkan dengan inhibitor aromatase (AI) selama 5 tahun/TAM hingga 10 tahun. Bila perempuan tetap pramenopause setelah 5 tahun terapi dapat diberikan TAM hingga 10 tahun/tidak diberikan terapi hormon lagi, (b). AI 5 tahun $\pm$ supresi ovarium atau ablasi. Supresi ovarium pada perempuan pramenopause dengan risiko tinggi rekurensi (usia muda, *grade* tumor yang tinggi, keterlibatan kelenjar getah bening, (c). AI selama 5 tahun, dan (d). TAM selama 2–3 tahun dilanjutkan dengan AI hingga lengkap terapi hormon 5 tahun. Pada penderita pascamenopause saat diagnosis KPD dapat diberikan beberapa alternatif terapi hormon antara lain: (a). AI selama 2–3 tahun dilanjutkan TAM hingga lengkap 5 tahun terapi, (b). TAM selama 4,5–6 tahun dilanjutkan dengan AI selama 5 tahun/TAM selama 5 tahun lagi hingga lengkap 10 tahun, (c). Perempuan dengan kontraindikasi, menolak/tidak toleran dengan AI dapat diberikan TAM selama 5 tahun/10 tahun terapi.¹⁰

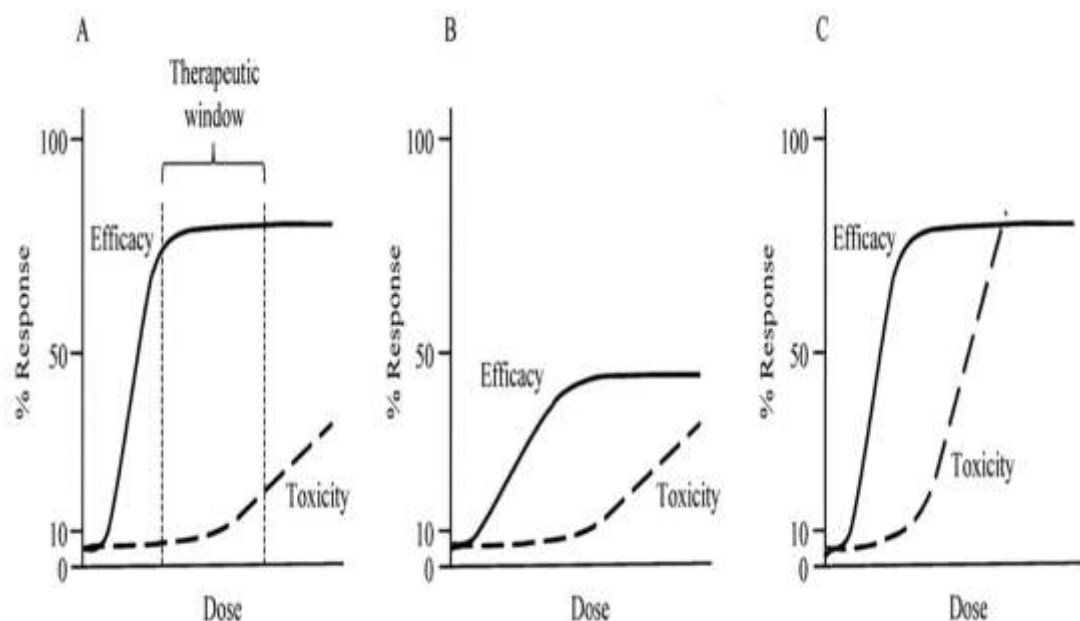
Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI)¹² membagi penatalaksanaan KPD berdasarkan stadium KPD. Terapi adjuvan KPD stadium dini berupa radioterapi, kemoterapi, terapi target, dan terapi hormon. Perempuan pramenopause dengan ER+ diberikan TAM/GnRH/bilateral salpingo-ooforektomi (BSO), sedangkan pascamenopause diberikan TAM, AI (anastrozol, letrozol, *exemestane*), dan *fluvestrant* dengan total lama pemberian 5 tahun. KPD stadium lanjut lokal (stadium III (T0-3, N2, M0), IIIB, dan IIIC) diberikan ChT neoadjuvan/hormonal. KPD stadium lanjut diberikan terapi paliatif. Penderita KPD stadium lanjut dengan reseptor hormon positif yang belum pernah diterapi hormon (*naive*) harus diberikan terapi hormon sebagai terapi primer.

2.2 Respons Terapi

Obat yang terbukti efektif pada banyak penderita seringkali tidak memperlihatkan respons terapi pada penderita lain, adakalanya bila suatu obat bekerja seringkali menimbulkan efek samping serius hingga kematian pada sebagian kecil penderita.

Variasi respons terapi dapat meliputi sebagian besar orang dalam suatu populasi (variabilitas populasi), atau terjadi pada orang yang sama pada waktu tertentu (variabilitas intraindividu).⁶⁷

Pemberian suatu obat pada dosis tertentu menimbulkan respons terapi berupa efikasi (kemampuan obat mencapai efek yang diinginkan/efektivitas) dan efek samping (respons terhadap obat yang tidak diinginkan/merugikan). Pemberian dosis lebih tinggi akan meningkatkan efek terapi obat tetapi secara simultan meningkatkan kecenderungan untuk timbulnya efek samping. Dosis obat yang merupakan rentang antara efek terapi dan timbulnya efek samping didefinisikan sebagai *therapeutic window* (**Gambar 2.6.**).⁶⁷



Gambar 2.6. Kurva Dosis – Respons Terapi⁶⁷

A. *Dose-dependent*=pemberian dosis obat menimbulkan efikasi lebih besar dibandingkan toksisitas obat. *Therapeutic window* didefinisikan sebagai dosis yang merupakan rentang antara efek terapeutik dan timbulnya efek samping. Gambar B dan C merupakan *atypical dose-response curve*. B=pemberian dosis obat menimbulkan efikasi tidak seberapa besar dengan toksisitas yang sama, dan C=pemberian dosis obat meningkatkan efikasi dan toksisitas jauh lebih besar.

Pada banyak obat, dosis optimum yang dibutuhkan untuk terapi efektif dan aman bervariasi bermakna dari satu penderita ke penderita lain. Dosis obat yang sudah berada dalam *therapeutic window* pada sebagian penderita dalam populasi dapat terlalu rendah atau terlalu tinggi pada sebagian penderita yang memiliki *atypical dose-response curve* untuk efek terapeutik obat, toksisitas, atau keduanya sehingga menghasilkan efek samping yang tidak diinginkan. Variasi individual umumnya mempunyai pengaruh lebih besar pada obat-obat dengan *narrow therapeutic window* misalnya warfarin.⁶⁷

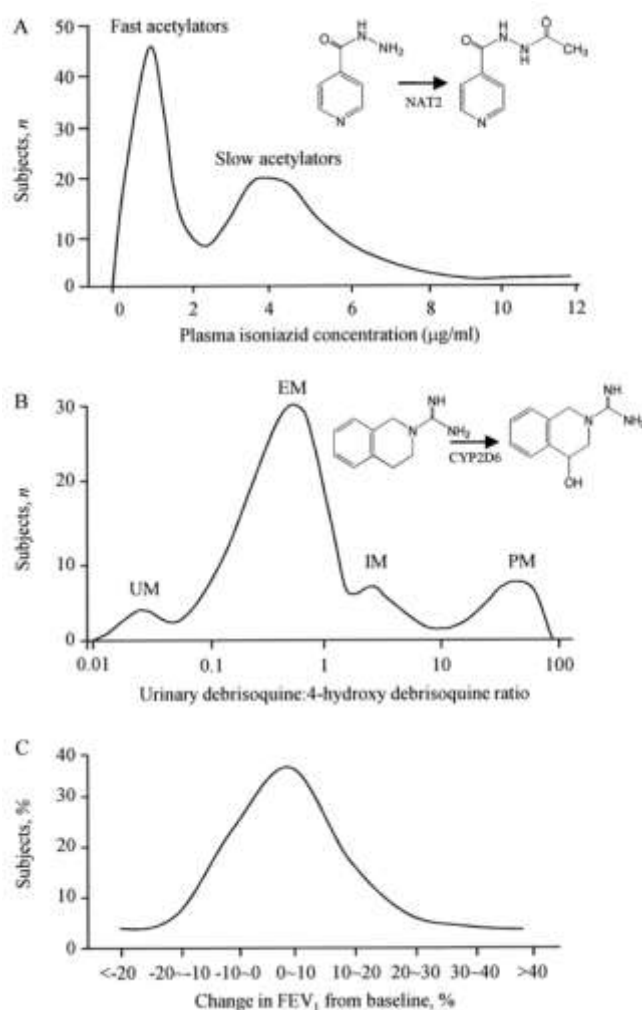
2.2.1 Faktor-Faktor yang Memengaruhi Respons Terapi Individu

Faktor yang menyebabkan variasi dalam respons terapi banyak dan kompleks antara lain faktor genetik (enzim pemetabolisme obat, transporter, target terapi obat), faktor lingkungan (bahan kimia di lingkungan, pemberian obat bersamaan, merokok, minum alkohol, dan makanan), dan faktor fisiologis (usia, jenis kelamin, penyakit, kehamilan, olahraga, *circadian rhythm*, dan kelaparan) dapat memberikan kontribusi di dalam variasi farmakokinetik maupun farmakodinamik obat. Faktor genetik pada umumnya menyebabkan perubahan permanen fungsi protein, sementara faktor lingkungan, dan fisiologis serta pengaruhnya pada respons obat bersifat sementara pada kebanyakan kasus. Faktor genetik dan non-genetik dapat menyebabkan variabilitas individual dalam respons terapi dengan cara memodulasi *dose-response curve* efikasi dan toksisitas obat (**Gambar 2.6.**).⁶⁷

2.2.1.1 Faktor Genetik dalam Respons Terapi

Polimorfisme genetik protein-protein yang terlibat dalam target obat (misalnya farmakodinamik) metabolisme dan transpor obat (misalnya farmakokinetik) seringkali merupakan sumber variabilitas individual paling penting. Variasi genetik dapat mengubah struktur protein target melalui mutasi bagian gen penyandi atau jumlah protein yang diekspresikan dengan modulasi regulasi gen, pada akhirnya keduanya akan mengubah fungsi protein atau kecepatan dan *kinetic constant* enzim. Polimorfisme genetik enzim pemetabolisme obat dan transporter dapat memengaruhi absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi obat dengan cara demikian memengaruhi kadar plasma dan jaringan.⁶⁷

Variasi genetik dapat dihasilkan dari *single nucleotide polymorphism* (SNP), insersi, delesi, atau duplikasi rantai DNA. SNP merupakan variasi genetik yang paling sering ditemukan, dan lebih dari 90% gen manusia mengandung paling sedikit 1 SNP. Lebih dari 14 juta SNP telah berhasil diidentifikasi dalam genom manusia, dan lebih dari 60.000 SNP ditemukan di dalam regio penyandi di dalam gen. Kebanyakan SNP tidak punya pengaruh pada fungsi gen, namun beberapa SNP yang ditemukan pada regio penyandi atau pada tempat lainnya transkripsi dapat menimbulkan implikasi klinis.⁶⁷



Gambar 2.7. Distribusi Fenotip Populasi akibat Respons Terapi⁶⁷

A. Distribusi bimodal kadar plasma isoniazid sebagai hasil dari polimorfisme NAT2 pada subjek yang memperoleh isoniazid. B. Distribusi multimodal ratio debrisoquin dan 4-hidroksidebrisokuin urin sebagai hasil polimorfisme CYP2D6 pada subjek yang mengonsumsi debrisoquin. C. Distribusi luas perubahan volume ekspirasi paksa pada subjek yang memperoleh steroid untuk terapi asma.

Efek dosis terhadap gen akibat *monogenetic inheritance* bermanifestasi pada distribusi fenotip polimorfisme genetik dalam suatu populasi. Ada tiga tipe genetik berdasarkan distribusi fenotip yang dihubungkan dengan respon obat yang telah dikenali antara lain bimodal, multimodal, atau luas tanpa adanya antimode yang nyata (**Gambar 2.7.**).⁶⁷

Asetilasi isoniazid digambarkan sebagai distribusi bimodal, monogenik. Individu dibagi menjadi dua subpopulasi yaitu asetilator cepat atau asetilator lambat dalam hubungannya dengan genotipe NAT2, sementara 4-hidroksilasi debrisoquin oleh CYP2D6 mengikuti distribusi multimodal, monogenik yang membagi populasi menjadi PM bila CYP2D6 inaktif, UM bila memiliki banyak kopi CYP2D6 dengan aktivitas sangat tinggi, IM bila aktivitas CYP2D6 berkurang, dan EM bila memiliki kecepatan metabolisme yang normal.⁶⁷

2.2.1.2 Faktor-Faktor Lain yang Berperan dalam Respons Terapi Kanker Payudara

Ada banyak faktor yang dapat memengaruhi prognosis suatu penyakit dan respons terapi yang diberikan. Faktor prognostik adalah setiap pengukuran yang tersedia pada saat pembedahan yang berkorelasi dengan *disease-free survival* (DFS) atau *overall survival* (OS) tanpa keberadaan terapi sistemik adjuvan. Sebaliknya faktor prediktif adalah setiap pengukuran yang dapat digunakan untuk memprediksi respons terapi seseorang. Faktor prognostik berhubungan dengan perjalanan alamiah penyakit sehingga dapat memilah pasien yang paling sering mengalami kambuhan tanpa terapi adjuvan, sementara faktor prediktif dapat mengidentifikasi terapi yang tepat bagi seorang pasien. Faktor prognostik harus dibedakan dari faktor prediktif, namun ada beberapa faktor seperti reseptor hormon dan overekspresi HER-2 yang merupakan faktor prognostik tetapi juga sekaligus merupakan faktor prediktif.³

Saat ini ada beberapa faktor prognostik yang diketahui dapat memengaruhi respons terapi KPD antara lain keterlibatan kelenjar limfe nodus aksilaris, ukuran tumor, ER α , PgR), Ki-67, HER2, stadium, karakteristik histologi, subtype molekular, invasi limfatik dan vaskular, usia pada saat di diagnosis KPD,^{3, 4} obesitas.⁵ Studi

menunjukkan frekuensi positif dan kadar ER dan PgR dan HER2 negatif meningkat dengan bertambahnya usia, dengan kadar tertinggi pada perempuan pascamenopause. ER dan PgR negatif dan HER2 positif dihubungkan dengan penyakit yang lebih lanjut dan luaran yang buruk.⁶⁸

Respons terhadap terapi endokrin pada KPD berkorelasi dengan status ER dan PgR. Penelitian yang bertujuan melihat prognosis hormon reseptor positif tunggal (ER-PgR+ dan ER-PgR+) dibandingkan dengan *double hormon reseptor* (ER+ PgR+) positif tanpa keberadaan HER-2 memperlihatkan hasil reseptor hormon positif tunggal tanpa overekspresi HER-2 dihubungkan dengan lebih buruknya survival dibandingkan kelompok yang memiliki *double hormon reseptor positif*, sebanding dengan buruknya survival pada *triple negative breast cancer* (ER-, PgR-, HER-2).⁶⁹

Studi yang dilakukan di Jepang membandingkan faktor prognostik pasien KPD. *The 48-month DFS rate* untuk luminal A, luminal B, HER2, dan BBC sub tipe masing-masing sebesar 94,2%, 71,3%, 70,6%, dan 76,2%, $p < 0,01$. Rekurensi KPD lebih sering pada sub tipe luminal B, HER2 vs. luminal A, namun *overall survival* tidak berbeda bermakna di antara kelompok sub tipe.⁷⁰ Sub tipe luminal A KPD mempunyai prognosis yang baik independen faktor prognostik lainnya seperti stadium TNM,⁷¹ sementara sub tipe luminal B KPD pada perempuan muda merupakan prediktor kuat untuk terjadinya rekurensi.⁷²

Studi menggunakan data *the Japanese Breast Cancer Registry* bertujuan melihat apakah usia muda saat diagnosis KPD merupakan faktor prognostik KPD menunjukkan pasien usia muda (< 35 tahun) dihubungkan dengan stadium TNM lanjut dan karakteristik KPD agresif (HER2 positif dan ER) dibandingkan usia pertengahan (35–50 tahun), dan tua (> 50 tahun). Usia muda merupakan faktor prognostik independen untuk DFS (HR = 1.73; 95 %IK= 1.42–2.10; $p < 0.001$) dan OS (HR = 1.58; IK95% 1.16–2.15; $p = 0.004$).⁷³

Studi yang dilakukan di Cina menggunakan *the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database* pada subjek dengan KPD primer non-metastasis menunjukkan usia pertengahan (≥ 40 tahun) secara bermakna dihubungkan dengan meningkatnya survival kecuali pasien dengan stadium III penyakit, dan lansia perempuan (usia ≥ 60 tahun) merupakan prediktor independen yang bermakna

untuk prognosis buruk dibandingkan usia muda.⁷⁴ Kedua studi tersebut menunjukkan faktor usia berperan sebagai prediktor independen prognostik KPD.

Hubungan antara ER β 2 dan respons terapi masih bersifat kontradiksi. Studi retrospektif menunjukkan tingginya ekspresi protein ER β 2 secara independen dihubungkan dengan lebih rendahnya rekurensi KPD (34%), sehingga berdasarkan studi tersebut ER β 2 dapat digunakan sebagai marker prediktif untuk terapi TAM.⁷⁵

Studi lain pada penderita KPD dengan terapi ajuvan TAM monoterapi menunjukkan ER β 1 dihubungkan dengan lebih baiknya survival secara bermakna.⁷⁶ Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh studi lain yang mendapatkan ekspresi ER β 2 pada lesi primer dihubungkan dengan respons terapi yang buruk terhadap TAM, terutama pada kanker dengan rendahnya skor Allred untuk PgR.⁷⁷

Tinjauan sistematis dan metaanalisis menunjukkan status ER β merupakan faktor prognostik yang berhubungan dengan DFS dan OS penderita KPD. Penderita KPD dengan ER α positif, ER β positif tidak dihubungkan dengan perbaikan DFS atau OS, sebaliknya pada penderita ER α negatif ekspresi ER β secara bermakna dihubungkan dengan perbaikan DFS dan OS.⁷⁸ Keberadaan ER β 1 atau ER β 2 tampaknya mengganggu fungsi ER α dan menyebabkan *down regulation* gen ER α *downstream*. Keberadaan ER β 1 dan ER β 2 dapat memengaruhi sensitivitas terhadap obat yang secara langsung dapat berikatan dengan ER α seperti halnya TAM.⁵⁴

Adiposa dihubungkan dengan meningkatnya risiko KPD dan mortalitas. Mekanisme yang mendasari adalah interaksi leptin, insulin, dan berbagai mediator inflamasi dapat memengaruhi pertumbuhan KPD.⁷⁹ Tinjauan sistematis dan metaanalisis yang dilakukan oleh Chan *et al.*⁵ bertujuan melihat hubungan Indeks Massa Tubuh (IMT) dan survival pada perempuan dengan KPD. Obesitas dihubungkan dengan OS lebih buruk pada perempuan KPD baik pra- dan pascamenopause. Perempuan pra-dan pascamenopause dengan obesitas (IMT > 30) mempunyai risiko relatif 1,75 kali dan 1,34 kali mengalami kematian. Tiap peningkatan 5 kg/m² peningkatan IMT sebelum, < 12 tahun setelah, dan $\geq$ 12 bulan setelah diagnosis meningkatkan risiko 17%, 11%, dan 8% mortalitas total, dan 18%, 14%, dan 29% mortalitas akibat KPD.⁵ Studi lain menunjukkan perempuan dengan

kadar adiposa yang tinggi (IMT dan WHR) lebih sering ditemukan pada *basal-like tumor*, tetapi lebih jarang ditemukan pada tumor luminal. IMT tinggi (≥ 30) pasca diagnosis KPD bersamaan dengan *basal-like tumor* dan *waist-to-hip ratio* yang tinggi ($\geq 0,84$) dihubungkan dengan mortalitas luminal. Berdasarkan hasil studi tersebut survival KPD dapat bervariasi dan dihubungkan dengan sub tipe intrinsik dan adiposa.⁸⁰

Terikatnya SERM pada ER menyebabkan hambatan poten pada sinyal estrogen yang dapat memperlemah oksidasi asam lemak dan menyebabkan timbulnya NAFLD. Pada penggunaan SERM (TAM dan toramifen) selama 3 tahun pertama dihubungkan dengan kejadian *nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD).

Studi Zheng *et al.*⁸¹ bertujuan meneliti hubungan NAFLD dengan luaran survival pasien KPD menunjukkan penderita yang mengalami NAFLD mempunyai DFS meningkat 41% dibandingkan kelompok yang tidak mengalami kejadian tersebut (HR = 0,59; IK95% 0,36–0,96; p = 0,033). Timbulnya kejadian NAFLD akibat SERM secara independen dihubungkan dengan meningkatnya DFS dan berguna untuk memprediksi respons terapi pada pasien KPD yang menggunakan SERM.⁸¹

Sebagian mekanisme yang menjelaskan hubungan tersebut adalah karena NAFLD dihubungkan dengan berkurangnya IGF-1,⁸² Adanya *crosstalk* antara IGF-1R dan ER, demikian juga MAPK/ERK dan PI3K/AKT *signaling downstream* dari sinyal IGF. Ekspresi berlebihan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dihubungkan dengan meningkatnya aktivitas reseptor tirosin kinase yang menyebabkan resistensi terhadap TAM dan *fulvestrant*.⁸³

2.3 Sitokrom P450

2.3.1 Famili Sitokrom P450

Sitokrom P450 (CYP) merupakan famili enzim utama yang terlibat dalam enzim metabolisme fase 1, yang berfungsi mengoksidasi sebagian besar substansi endogen (misalnya eikosanoid dan steroid) dan xenobiotik (misalnya obat dan substansi yang ada di lingkungan) menjadi substansi yang lebih hidrofilik (lebih larut dalam air).

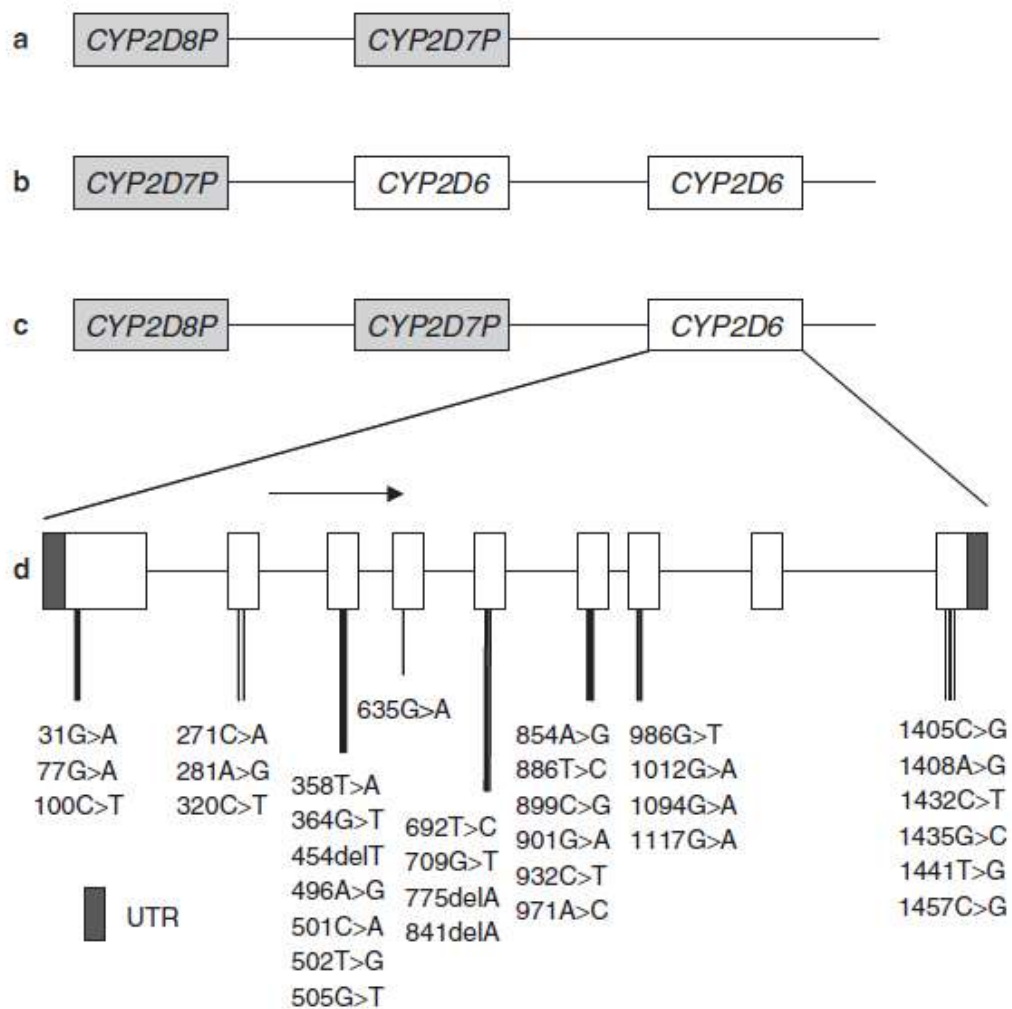
Hingga saat ini pada manusia ada 57 gen CYP fungsional dan 58 pseudogen yang dikelompokkan dalam 18 famili (misalnya CYP1-5, 7, 8, 11, 17, 19-21, 24, 26, 27, 39, 46, dan 51).⁸⁴ Famili CYP 1, 2, dan 3 merupakan subfamili yang bertanggungjawab pada 70–80% metabolisme obat dan xenobiotik. CYP yang paling banyak diekspresikan di hepar adalah CYP3A4, 2C9, 2C8, 2E1, dan 1A2, sementara CYP2A6, 2D6, 2B6, 2C19 and 3A5 ditemukan dalam jumlah kecil di hepar, dan CYP 2J2, 1A1, dan 1B1 terutama diekspresikan di ekstrahepatik. Sebagian besar oksidasi obat pada manusia diperantarai oleh CYP sebagai berikut 1A2 (8,9%), 2A6 (3,4%), 2B6 (7,2%), 2C8 (4,7%), 2C9 (12,8%), 2C19 (6,8%), 2D6 (20%), 2E1 (3%), 2J2 (3%), dan 3A4/5 (30,2%).⁸⁴

2.3.2 Substrat CYP2D6

CYP2D6 merupakan satu dari CYP yang paling banyak diteliti secara intensif dalam kaitannya dengan polimorfisme. CYP2D6 ditemukan dalam kadar kecil pada hepar (2–4%), namun enzim ini memetabolisme $\pm$ 25% obat di hepar. Tipikal substrat CYP2D6 bersifat lipofilik, dan meliputi beberapa obat antara lain antidepresan trisiklik dan generasi kedua (aminotriptilin, paroxetin, venlafaxin), antipsikotik (aripiprazole, risperidon), antiaritmia (propafenon, mexiletin, flecainid), antiemetik (ondansetron, dolansetron, metoklopramid), antagonis β -adrenoreseptor (metoprolol, atenolol, bisoprolol, timolol, dll), dan opioid (kodein, tramadol), antikanker *selective estrogen receptor modifier* (SERM).⁸⁵

2.3.3 Lokus Gen CYP2D6

Gen CYP2D6 dipetakan dalam kromosom 22q13.1 yang terdiri dari 9 ekson yang terdiri dari 4.378 pasang basa (bp), dengan *open reading frame* yang terdiri dari 1491 pasang basa yang mengkode 497 asam amino.⁸⁵ Gen CYP2D6 diapit oleh dua pseudogen CYP2D7P dan CYP2D8P yang memiliki 95% untaian homolog dengan CYP2D6. CYP2D7 berada *downstream* dari CYP2D8P mengandung sebuah insersi T di dalam ekson 1, sementara CYP2D8P meliputi multipel delesi dan insersi di dalam ekson (**Gambar 2.8**).⁸⁵

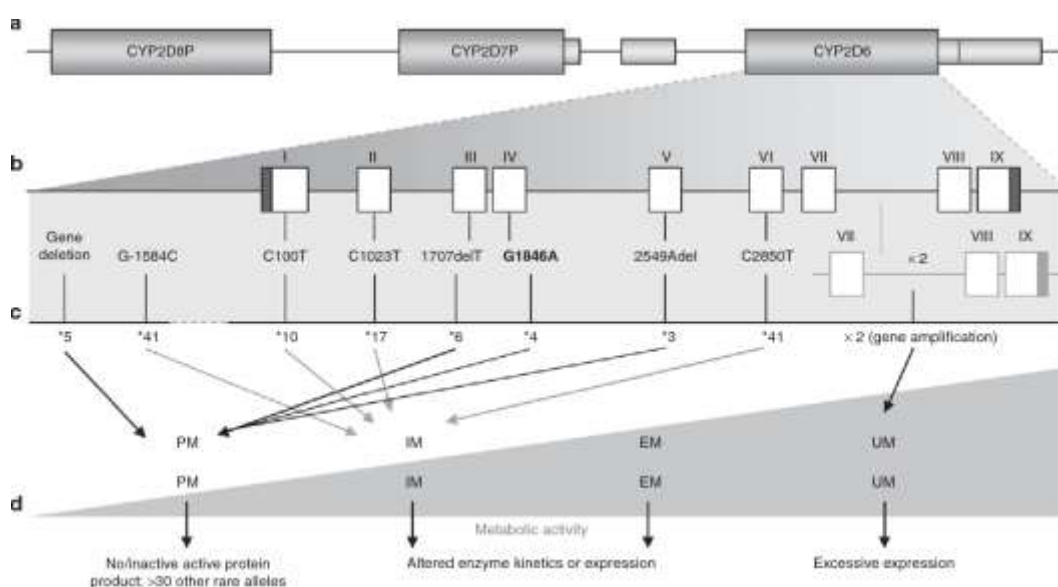


Gambar 2.8. Pengelompokan Gen CYP2D6 pada Manusia dan *Single Nucleotide Polimorphisms* yang Umum Ditemukan pada Gen CYP2D6⁸⁵

CYP2D6 dikelompokkan dalam kelompok pseudogen CYP2D7P dan CYP2D8P inaktif dengan sifat homolog yang sangat tinggi. Gen CYP2D6 terdiri dari 9 ekson. (a). Semua gen dapat dihapus (CYP2D6*5); (b). Duplikasi atau multiplikasi CYP2D6 (tandem copy N=2-12); (c). Lokus CYP2D6; dan (d). *Single nucleotide polimorphism* (SNP) yang umum ditemukan di dalam gen CYP2D6. CYP=sitokrom P450; UTR=*untranslated region*.

Sebagian besar varian alel CYP2D6 ditandai oleh kehadiran satu atau lebih *single nucleotide variations* (SNV) yang meliputi variasi 1 pasang basa dalam sekuens gen (*single nucleotide polimorphisms*/ SNP), insersi atau delesi satu atau sebagian kecil nukleotida (basa penyusun asam nukleat). Tergantung dari variasi dan lokasi di dalam gen, alel dapat bersifat non-fungsional misalnya CYP2D6*4 (*splice defect*), CYP2D6*3 dan *6 (*single nucleotide deletion causing frame shifts*), CYP2D6*7 (pertukaran asam amino), CYP2D6*10 (pertukaran asam amino) memengaruhi stabilitas enzim.⁸⁶

CYP2D6 merupakan gen yang kompleks dan sulit untuk dilakukan *genotyping* karena banyaknya jumlah varian gen tersebut. Hingga saat ini ada lebih dari 100 varian alel CYP2D6 yang telah berhasil diidentifikasi dengan aktivitas metabolik berbeda. Ditambah lagi dengan adanya deleksi/insersi, duplikasi, multiplikasi, dan pseudogen menambah kekompleksan dalam melakukan *genotyping*.⁸⁶ Pada **Gambar 2.9.** dapat dilihat polimorfisme pada alel CYP2D6*10 dan alel lainnya pada gen lokus CYP2D6 beserta efek yang timbul terhadap aktivitas metaboliknya (prediksi fenotip berdasarkan alel).



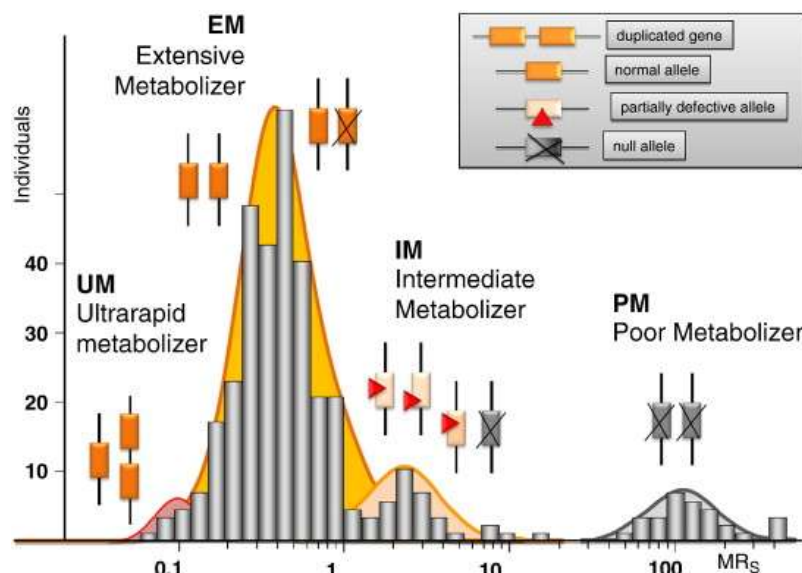
Gambar 2.9. Polimorfisme Alel CYP2D6*10 (c.100C>T) dan Efek yang Timbul terhadap Aktivitas Metaboliknya⁸⁷

Polimorfisme gen CYP2D6 lokus dan pseudogen CYP2D7P dan CYP2D8P (a), ada lebih dari 100 varian alel yang telah berhasil diidentifikasi yang meliputi SNP, insersi/delesi, duplikasi, multiplikasi (b), Alel CYP2D6*10 (subststitusi C100T pada ekson 1) merupakan SNP yang sering ditemukan pada etnik Asia (b,c), CYP2D6*10 (pertukaran asam amino) memengaruhi stabilitas enzim yang akan mengurangi aktivitas metabolik enzim yang dikenal sebagai *intermediate metabolizer* (d)

Penamaan alel CYP2D6*10 diberikan berdasarkan *database the human cytochrome P450 allele nomenclature*. Saat ini ada 4 varian alel CYP2D6 yang sudah diketahui yaitu *10A, *10B, *10C dan *10D yang secara kolektif disebut sebagai *10 untuk tujuan diagnostik.⁸⁸ Pada semua varian alel CYP2D6*10

ditemukan substitusi pada c.100C>T. Substitusi c.100C>T pada ekson 1 menyebabkan terjadinya substitusi prolin dengan serin (Pro34Ser) sehingga terbentuknya enzim tidak stabil dengan aktivitas yang rendah.

2.3.4 Prediksi Fenotip CYP2D6 Berdasarkan Alel



Gambar 2.10. Distribusi Genotip dan Fenotip CYP2D6 Akibat Metabolisme Oksidasi Spartain pada Populasi⁸⁸

Aktivitas metabolik CYP2D6 berdasarkan alelnya bisa diklasifikasikan sebagai normal (*1, *2, *33, *35), berkurang (*9, *10, *17, *29, *41, *69), tidak ada (*3, *4, *6, *7, *8, *11-15, *18-21, *31, *38, *40, *42, *44), atau meningkat (*2XN, *35X2).⁸⁸

Polimorfisme gen CYP2D6 akan menimbulkan variasi fenotip yang akan membagi populasi berdasarkan aktivitas fungsional enzimnya. *Poor metabolizer* (PM): keberadaan dua alel non-fungsional (*null allele*), misalnya *3 dan *4; *extensive metabolizer* (EM): keberadaan satu/dua alel dengan fungsi normal, misalnya *2; *intermediate metabolizer* (IM) : keberadaan 1 *null allele* dan 1 alel dengan fungsi berkurang, atau 2 alel dengan fungsi berkurang, misalnya *10; dan *ultrarapid metabolizer* (UM) : varian dengan fungsi lebih akibat duplikasi gen fungsional (*gain-of-function variant*) (Gambar 2.10.).⁸⁴

Implikasi klinis polimorfisme enzim pemetabolisme obat harus dipertimbangkan di dalam konteks farmakologi. Bila obat secara farmakologi aktif varian dengan fungsi yang hilang akan menyebabkan berkurangnya *clearance* dan meningkatnya kadar obat dalam plasma sehingga meningkatkan efek obat bahkan dapat timbul efek samping obat, sementara varian dengan fungsi lebih akan menyebabkan meningkatnya *clearance* dan lebih rendahnya kadar obat dalam plasma sehingga akan mengurangi efek obat. Bila suatu obat diaktivasi secara metabolik (*prodrug*), hasil yang bertolak belakang akan terjadi, dan metabolit yang aktif secara farmakologi atau metabolit toksik harus dipertimbangkan sebagai dampak dari adanya polimorfisme genetik.⁸⁴

2.3.5 Distribusi Polimorfisme Genetik CYP2D6 antar Etnik

Gen CYP2D6 sangat polimorfik sehingga menimbulkan variabilitas luas dalam distribusi alel CYP2D6 yang berdampak pada bervariasinya persentase PM, IM, EM, UM interindividu dan etnik.⁸⁵ Alel CYP2D6*10 (alel dengan fungsi berkurang) lebih sering ditemukan pada populasi Asia (40%), sementara alel CYP2D6*4 (alel non-fungsional) lebih sering ditemukan pada populasi Kaukasia (11,7%), namun di Asia sangat jarang ditemukan (< 1%).⁸⁹ Pada etnik Asia umumnya mempunyai fenotip IM (30–57%).³²

Alel CYP2D6*10 merupakan alel yang sering ditemukan di Asia yang berkaitan dengan fenotip IM. Frekuensi alel CYP2D6*10 pada beberapa etnik Asia antara lain: di Thailand (53%),³⁰ Vietnam (58,5%) dan Filipina (52,4%),³³ etnik Melayu Malaysia (28,9%), dan Cina (57,1%),⁹⁰ Mereka akan rentan untuk kurang mendapatkan terapi optimal pada penggunaan TAM. Polimorfisme CYP2D6 mengakibatkan bervariasinya kadar END sebesar 30–53%.^{17, 23}

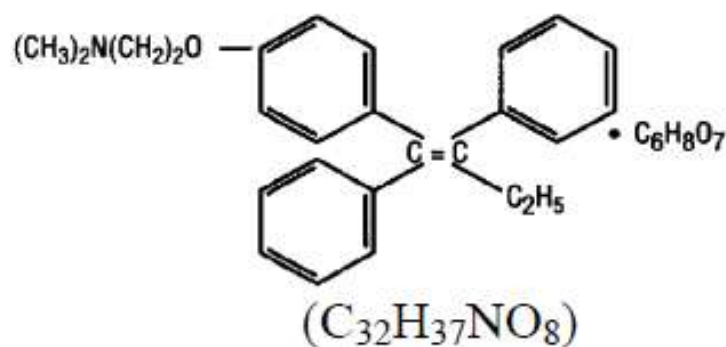
2.4 Modulator Reseptor Estrogen

Saat ini ada beberapa modulator ER yang telah dikenal dengan indikasi yang berbeda-beda. Beberapa modulator reseptor estrogen yang ada saat ini antara lain: TAM, raloksifen, lasofoksifen, toramifen., *fluvestrant*, klomifen, ormeloksifen, *femarelle*, bezedoksifen, arzoksifen, dan afimoksifen.

2.4.1 Tamoksifen

2.4.1.1 Struktur

Tablet TAM (Novaldex®) 20 mg mengandung TAM sitrat yang ekuivalen dengan 20 mg TAM. Secara kimia Novaldex merupakan transisomer derivat trifeniletilen. Nama kimianya adalah (Z)-2-[4-(1,2-diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N, N-dimethylethanamine 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylate (1:1). TAM sitrat mempunyai berat molekul 563.62, dan pKa = 8.85. Struktur dan formula empirisnya dapat dilihat pada **Gambar 2.11**.⁹¹



Gambar 2.11. Struktur Kimia dan Formula Empiris Tamoksifen Sitrat.⁹¹

2.4.1.2 Mekanisme Kerja

TAM adalah antagonis ER yang merupakan *selective estrogen receptor modulator* (SERM) yang digunakan saat ini untuk tatalaksana KPD dengan ekspresi ER (+). Mekanisme kerja TAM adalah dengan cara berkompetisi dengan E2 dan berikatan dengan LBD *pocket* ER. Terikatnya metabolit TAM akan menginduksi perubahan konformasi. Heliks 12 di dalam LBD berfungsi sebagai *molecular switch* mengadopsi konformasi aktif dengan keberadaan agonis (E2) menyebabkan interaksi protein koregulator dengan AF-2 *coregulator-binding surface*. Pemberian TAM yang dikonversi menjadi 4-hidroksiTAM (metabolit) menyebabkan heliks 12 mengalami rotasi dan menempati AF-2 *coregulator-binding surface* sehingga menghasilkan efek antagonisme transkripsi.^{51, 52} Imbas efek di atas adalah berkurangnya akumulasi E2 di dalam jaringan target E2 pada manusia.⁵²

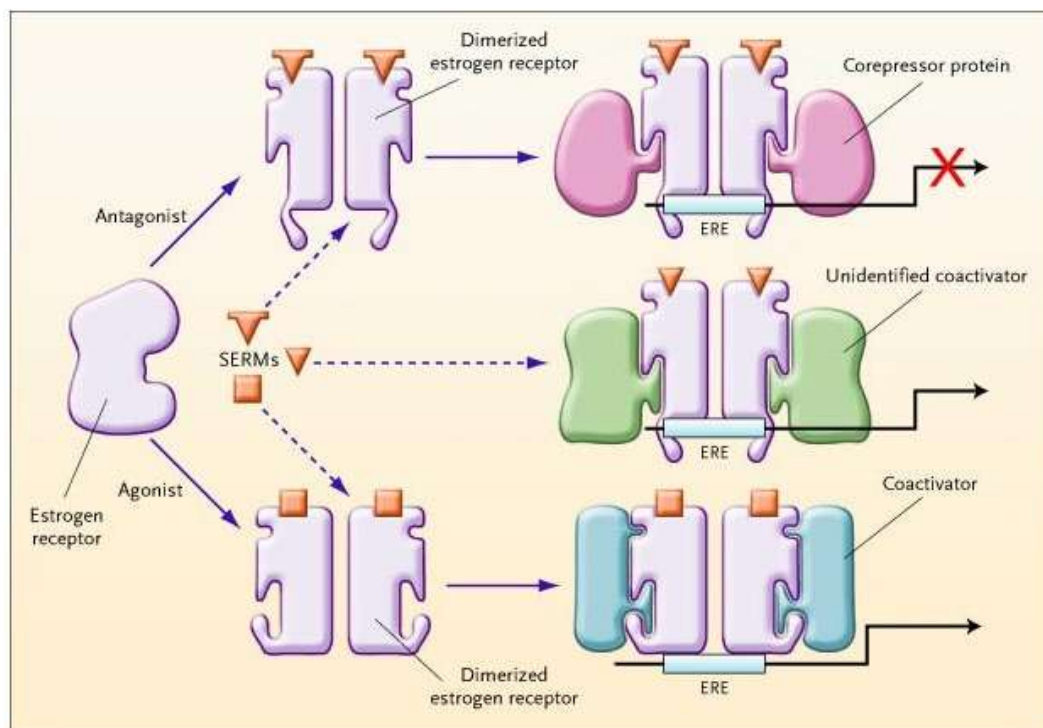
Studi *in vitro* menunjukkan beberapa metabolit TAM seperti END dan N-desmetil-TAM juga merupakan inhibitor poten enzim aromatase (CYP19).⁹² Potensi metabolit ini dalam menghambat aktivitas aromatase sebanding dengan efek letrozole, obat yang memang merupakan inhibitor aromatase.⁹²

TAM memperlihatkan aktivitas campuran agonis dan antagonis tergantung dari besarnya dosis yang diberikan, sel, jaringan, dan spesies. Pada sel KPD manusia dan uterus tikus pemberian TAM dosis rendah menghasilkan efek stimulasi (agonis) pada pertumbuhan sel, sementara pemberian TAM dosis tinggi menyebabkan konversi aktivitas agonis menjadi antagonis (menghambat pertumbuhan sel).⁹³

Tergantung dari jaringan dan spesiesnya, TAM memperlihatkan efek campuran agonis/antagonis pada jaringan manusia dan tikus, namun bersifat agonis murni pada tikus dan marmot.⁹³ Pada manusia TAM mempunyai efek estrogenik dan antiestrogenik tergantung pada jaringan target. TAM memperlihatkan efek campuran yaitu sebagai antagonis estrogen pada jaringan payudara dan secara kompetitif menghambat sel KPD memperoleh estrogen yang diperlukan untuk perkembangannya dan sebagai agonis (efek stimulasi) pada uterus (meningkatkan proliferasi sel endometrium) dan jaringan tulang.⁹³

Efek farmakologi campuran yang dimiliki oleh TAM tergantung pada ekspresi regulator protein yang selektif terhadap jaringan, yang akan berinteraksi dengan ER pada promotor gen sehingga menimbulkan efek meningkatkan atau merepresi transkripsi gen dependen ER. Contohnya *steroid receptor coactivator 1* (SRC1/NCOA1) diekspresikan pada kadar tinggi di uterus dan kadarnya rendah di jaringan payudara. TAM menginduksi rekrutmen SRC1 pada promotor gen dependen ER di dalam jaringan uterus dan menginduksi rekrutmen korepresor pada promotor gen ER di dalam jaringan payudara.⁵²

Efek farmakologi SERM yang unik dapat dijelaskan dengan 3 mekanisme sebagai berikut: (a). Adanya perbedaan ekspresi ER pada jaringan target; (b). Perbedaan konformasi ER tergantung pada ligan yang berikatan dengan ER; (c). Perbedaan ekspresi dan ikatan dengan protein regulator transkripsi (koaktivator atau korepresor). Mekanisme kerja SERM dapat dilihat pada **Gambar 2.12**.⁹⁴



Gambar 2.12. Mekanisme Kerja *Selective Estrogen Receptor Modulator* pada Reseptor Estrogen⁹⁴

Tiap kelas SERM (simbol warna orange) walaupun mempunyai bentuk yang berbeda semuanya terikat pada ER. Pada saat estrogen, antiestrogen, atau SERM pada ER, ER mengalami perubahan konformasi yang menyebabkan terjadinya dimerisasi spontan dan selanjutnya memfasilitasi interaksi antara dimer dengan *estrogen response element* (ERE) yang terletak di dalam sel target. Kompleks ligan dan ER kemudian berikatan dengan berbagai protein koregulator yang akan menimbulkan konformasi struktur yang bervariasi tergantung ligan. Beberapa kompleks ER-SERM merekrut korepresor (warna ungu tua) yang akan meningkatkan aktivitas antagonis, sementara rekrutmen koaktivator lainnya (warna biru) meningkatkan aktivitas agonisnya. Beberapa SERM juga dapat memfasilitasi interaksi ER dengan koaktivator yang belum diidentifikasi (hijau). Estrogen maupun antiestrogen tidak akan berikatan dengan normal. Estrogen memfasilitasi interaksinya dengan ER dengan koaktivator, sementara antagonis mengaktifkan ER terutama melalui korepresor. Ikatan berbagai SERM pada ER menyebabkan reseptor mengadopsi perubahan konformasi yang berbeda satu dengan lainnya dan juga berbeda dari induksi oleh agonis atau antagonis estrogen klasik. Aktivitas SERM akan dipengaruhi oleh kadar relatif ekspresi protein koregulator (korepresor dan koaktivator) yang diekspresikan pada sel target berbeda.

2.4.1.3 Farmakokinetik

Setelah pemberian dosis tunggal TAM 20 mg per oral, rerata kadar puncak plasma 40 ng/mL (berkisar antara 35–45 ng/mL) tercapai dalam 5 jam setelah pemberian obat. Eliminasi TAM bersifat bifasik dengan waktu paruh eliminasi terminal berkisar 5–7 hari. Rerata *Steady state plasma concentration* (C_{ss}) TAM dan N-desmetil-TAM setelah pemberian 20 mg TAM sekali sehari selama 3 bulan adalah

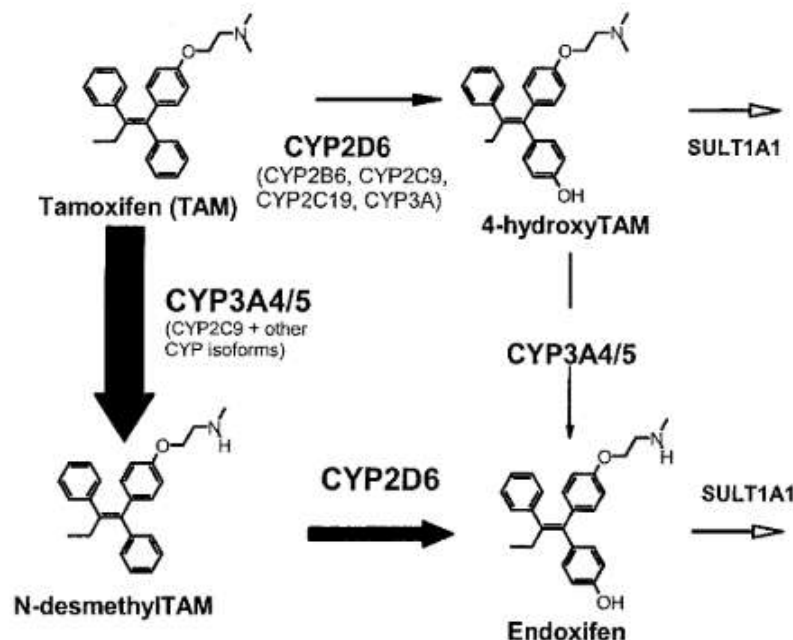
122 ng/mL (berkisar 71–183 ng/mL) dan 353 ng/mL (berkisar 152–706 ng/mL). Css TAM tercapai dalam ± 4 minggu sementara untuk N-desmetilTAM adalah ± 8 minggu dengan waktu paruh eliminasi ± 14 hari.⁹¹ Kadar END dalam serum manusia berkisar antara 10–150 nM, konsentrasi END dalam jaringan 10–100 kali lebih tinggi (10 μ M) daripada kadar dalam serum.

Studi *in vitro* yang dilakukan oleh Gjerde *et al.*⁹⁵ menunjukkan kadar TAM dan metabolitnya dalam jaringan KPD berhubungan secara bermakna dengan kadar serumnya, bahkan kadar dalam jaringan KPD lebih tinggi 5–10 kali dibandingkan kadar yang terukur di serum, kecuali untuk metabolit TAMNox. Tingginya kadar dalam jaringan KPD konsisten dengan luasnya volume distribusi TAM pada manusia yaitu 50–60 liter/kg. Selain volume distribusi obat yang luas, faktor lain yang menyebabkan lebih lamanya pajanan jaringan terhadap obat adalah panjangnya waktu paruh NDMT (± 14 hari), dengan waktu paruh END lebih panjang dari 14 hari.⁹¹

Metabolisme TAM bersifat kompleks dan terjadi secara ekstensif oleh enzim hati melibatkan jalur metabolisme primer dan sekunder menghasilkan metabolitnya masing-masing. Studi *in vitro* memperlihatkan ada banyak isoform CYP (CYP3A, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, dan CYP1A2) yang terlibat di dalam biotransformasi TAM menghasilkan metabolit primer.⁹⁶ Hasil metabolisme TAM menghasilkan 2 metabolit primer yaitu N-desmetil-TAM dikatalisasi terutama oleh CYP3A4/5 dan 4-hidroksi-TAM terutama oleh CYP2D6. Tiap metabolit primer mengalami metabolisme kembali menjadi metabolit sekunder yaitu (Z)-4-hidroksi-N-desmetil-TAM (END) sebagian besar melalui biokonversi N-desmetil-TAM (CYP2D6) dan sebagian kecil dari 4-hidroksi-TAM (CYP3A4/5). Hasil studi ini menunjukkan isoform CYP2D6 mempunyai peran besar di dalam pembentukan END maupun 4-hidroksi-TAM (**Gambar 2.13.**).¹³

TAM merupakan antiestrogen yang dianggap sebagai *prodrug* karena efek antiestrogen timbul diketahui terutama akibat terbentuknya 2 metabolit aktif yaitu (Z)-4-hidroksi-N-desmetil-TAM (END) dan 4-hidroksi-TAM. Efek antiestrogen 4-hidroksi-TAM 30–100 kali lebih poten dibandingkan TAM (*parent drug*), namun jalur hidroksilasi hanya memberikan kontribusi $\pm 7\%$ di dalam metabolisme

TAM, sementara jalur N-demetilasi memberikan kontribusi pada $\pm 92\%$ di dalam metabolisme TAM.⁹⁷



Gambar 2.13. Biotransformasi Tamoksifen Menjadi Endoksifen¹⁶

CYP3A4/5 merupakan isoform utama yang berperan dalam pembentukan N-desmetil-TAM. Pembentukan 4-hidroksi-TAM dan END secara predominan dikatalisis oleh CYP2D6.¹³ Isoform CYP lainnya seperti CYP2C19, CYP2C9, dan CYP2B6 tampaknya memainkan peran kecil dalam metabolisme. Kadar 4-hidroksi-TAM relatif lebih rendah dibandingkan N-desmetil-TAM menunjukkan jalur metabolisme utama TAM (*parent drug*) melalui N-demetilasi. Jalur metabolisme primer TAM menjadi END awalnya melalui N-demetilasi oleh CYP3A4 menjadi N-desmetil-TAM diikuti oleh hidroksilasi oleh CYP2D6 menghasilkan END. *Sulfotransferase Family 1A Member 1* (SULT1A1) juga berperan dalam sulfatasi 4-hidroksi-TAM dan berperan dalam klirens END.¹⁶

END dan 4-hidroksi-TAM mempunyai potensi antiestrogenik yang serupa, namun kadar plasma END lebih tinggi di atas 10 kali lipat dibandingkan 4-hidroksiTAM (dengan variabilitas interindividu yang luas).⁹⁷ Selain itu, END secara unik mempunyai target kerja pada ER α (yang dikode oleh gen ESR1) yang berperan dalam terjadinya degradasi proteasomal, sehingga END dapat mengurangi kadar protein ER α , sementara metabolit lain semata-mata menstabilkan mereka.⁹⁸ Kedua hal itu menyebabkan END merupakan metabolit utama yang berperan di dalam keberhasilan terapi TAM.

Inaktivasi TAM dan metabolitnya melalui glukuronidasi dan sulfatasi melalui perantaraan UGT dan SULT. Glukuronidasi merupakan jalur eliminasi predominan. Sebanyak 65–75% dosis TAM yang diberikan diekskresi melalui saluran empedu dan feses dalam ± 2 minggu.⁹¹

2.4.1.3.1 *Prodrug* dan Metabolit aktif

Clearance obat dari tubuh terjadi melalui tiga mekanisme yaitu ekskresi renal obat utuh, ekskresi bilier obat utuh diikuti dengan eliminasi melalui feses, dan metabolisme. Pada *clearance* metabolik, sebuah obat dikonversi menjadi metabolit. Pada sebagian besar kasus, metabolit terbentuk karena adanya perubahan kimia pada *parent drug* yang menyebabkan kapasitas untuk berikatan dengan reseptornya sebagian besar berkurang atau hilang. Namun pada beberapa kasus metabolit dapat mempunyai aktivitas intrinsik (berikatan pada target tanpa keberadaan salah satu dari faktor-faktor lain yang terjadi pada sistem yang lebih kompleks seperti organisme utuh, jaringan, atau pemeriksaan selular *in vitro*) pada reseptor target yang akan memberikan kontribusi pada efek farmakologi *in vivo*.⁹⁹

Prodrug adalah *parent drug* yang tidak aktif secara farmakologi. Untuk jadi aktif dan menimbulkan efek farmakologi harus mengalami konversi oleh serangkaian reaksi metabolisme menjadi metabolit aktif. *Prodrug* pada umumnya dibentuk untuk mengatasi absorpsi obat yang jelek atau memperpanjang waktu paruh. Beberapa obat yang mempunyai metabolit aktif dipertimbangkan sebagai *accidental prodrug*.⁹⁹

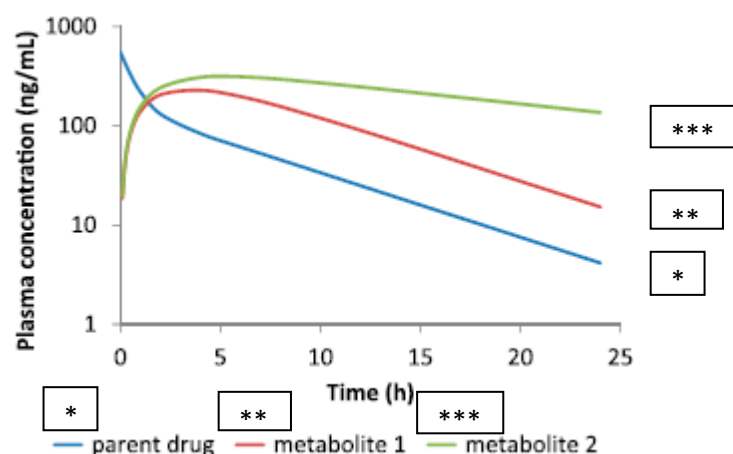
Pajanan reseptor target terhadap metabolit aktif ditentukan oleh beberapa faktor seperti kecepatan dan lamanya pembentukan metabolit, kecepatan metabolisme metabolit diikuti dengan *clearance*, penetrasi jaringan target, dan fraksi bebas. Pengetahuan ini penting di dalam menentukan dosis obat yang diperlukan untuk efikasi dan penyebab variasi interindividual dalam *dose concentration effect relationship*.⁹⁹

2.4.1.3.2 Efek Metabolit Aktif terhadap Farmakokinetik

Berdasarkan sudut pandang farmakokineik, metabolit (aktif dan inaktif) seringkali dihubungkan mempunyai *formation rate-limiting kinetics* atau *elimination rate-limiting kinetics*. Bila kecepatan eliminasi metabolit tidak melebihi kecepatan

eliminasi *parent drug* asalnya disebut *formation rate-limiting kinetics* ditandai dengan $t_{1/2}$ lebih pendek dibandingkan bila metabolit dibentuk setelah pemberian *parent drug*, *clearance* lebih tinggi dan/atau volume distribusi lebih rendah bila dibandingkan *parent drug*.⁹⁹ Pada *elimination rate-limiting kinetics*, $t_{1/2}$ dari metabolit lebih panjang dibandingkan *parent drug*, dan nilai ini akan sama terlepas apakah metabolit timbul setelah pemberian *parent drug* atau metabolit diberikan secara langsung. Bila metabolit menunjukkan *elimination rate-limiting kinetics*, pada pemberian berulang *parent drug*, metabolit potensial mengalami akumulasi dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan *parent drug* pada saat *steady state*. (Gambar 2.14).⁹⁹

Fenomena distribusi sebagian besar ditentukan oleh interaksi kapasitas yang tinggi, ikatan nonspesifik antara obat dengan makromolekul jaringan dan struktur makromolekul (misalnya membran fosfolipid). Interaksi ini sangat ditentukan oleh sifat fisikokimia obat, terutama lipofilisitas dan status ionisasi. Lipofilisitas dan ionisasi merupakan sifat yang menyebabkan peningkatan ikatan nonspesifik dengan struktur makromolekular jaringan. Sebagian besar reaksi biotransformasi menyebabkan berkurangnya sifat lipofilisitas, metabolit cenderung tidak menembus ke dalam jaringan sebaik *parent drug*.⁹⁹



Gambar 2.15. Formation Rate-Limiting dan Elimination Rate-Limiting Kinetics Metabolit⁹⁹

Metabolit 1 menunjukkan *formation rate-limiting kinetics* karena $t_{1/2}$ metabolit sama dengan *parent drug*. Metabolit 2 menunjukkan *elimination rate-limiting kinetics* karena metabolit mempunyai $t_{1/2}$ lebih panjang dibandingkan *parent drug*.

Kemampuan metabolit aktif menembus jaringan target relatif terhadap *parent drug* juga diperlukan untuk memahami apakah metabolit itu sebenarnya merupakan metabolit aktif. Walaupun metabolit aktif memiliki potensi intrinsik sebanding dengan *parent drug*, bila kadar bebas metabolit di dalam jaringan lebih rendah dibandingkan *parent drug*, metabolit tidak akan memberikan kontribusi sebanyak *parent drug*.⁹⁹

Penetrasi membran seringkali juga merupakan fungsi *polar surface area* (PSA). peningkatan PSA seringkali mengurangi penetrasi ke dalam jaringan. Hampir semua reaksi biotransformasi menghasilkan peningkatan PSA yang menyebabkan metabolit cenderung menjadi kurang permeabel terhadap membran dibandingkan *parent drug*. Bila metabolit masih tetap permeabel terhadap membran, namun masih lebih rendah permeabilitasnya dibandingkan *parent drug*, akan menyebabkan lebih lamanya waktu yang dibutuhkan metabolit untuk mencapai *steady state* di dalam jaringan dibandingkan waktu yang dibutuhkan oleh *parent drug*.⁹⁹

2.4.1.4 Efek Samping

Efek samping TAM yang paling sering ditemukan adalah *hot flashes* (kulit kemerahan), kelelahan, perubahan *mood*, *vaginal discharge*, hiperplasia endometrial, tromboemboli, stroke, katarak, gangguan fungsi hati.⁹¹ Hingga saat ini hubungan antara kadar END dan efek samping *hot flashes* yang sering ditemukan pada penggunaan TAM masih kontradiksi. Studi yang dilakukan oleh Perez *et al.*¹⁰⁰ menunjukkan efek samping *hot flashes* lebih sering ditemukan pada subjek berusia < 50 tahun (59%). Studi yang dilakukan oleh Lorzio *et al.*¹⁰¹ menunjukkan efek samping yang umum ditemukan pada penggunaan TAM adalah *hot flashes* (64%), kekeringan vagina (35%), gangguan tidur (36%), peningkatan berat badan (6%), depresi, iritabilitas, dan *mood swing* (6%). Prediktor efek samping yang berhasil diidentifikasi pada penggunaan TAM adalah lama terapi, usia muda, penggunaan terapi hormon pascamenopause sebelumnya, dan kadar END.¹⁰¹

Perempuan yang menggunakan TAM > 12 bulan lebih jarang melaporkan efek samping (OR = 0,15; IK95% 0,04–0,58) dan efek samping berat (OR = 0,05; IK95% 0,005–0,58) dibandingkan perempuan yang menggunakan TAM < 12 bulan. Berdasarkan usia, dibandingkan perempuan yang berusia < 50 tahun maka

perempuan berusia 60–70 tahun (OR = 0,22; IK95% 0,03–1,35) dan > 70 tahun (OR = 0,13; IK95% 0,01–0,99) lebih jarang melaporkan efek samping. Perempuan yang sebelumnya menggunakan terapi hormon pascamenopause lebih sering melaporkan efek samping yang berat. Perempuan dengan kadar END yang lebih tinggi lebih sering melaporkan efek samping (OR = 1,67; IK95% 1,01–2,77), rerata kadar END populasi $8,77 \pm 6,31$ ng/mL. Subjek yang tidak melaporkan efek samping kadar END-nya lebih rendah 2 ng/mL. Studi yang dilakukan oleh Larizio *et al.*¹⁰¹ menunjukkan kadar serum END dihubungkan dengan meningkatnya risiko *hot flashes* walaupun tidak bermakna secara statistik.

Pada *Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trial*,³⁷ yang diikuti 3964 subjek, sebanyak 37,5% subjek yang melaporkan efek samping *hot flashes* dalam 3 bulan pertama mempunyai rekurensi secara bermakna lebih rendah dibandingkan subjek yang tidak melaporkan efek samping, HR = 0.84; IK95% 0.71–1.00, $p = 0.04$. Berdasarkan hasil studi tersebut kadar END dapat digunakan untuk memprediksikan efek samping maupun risiko kekambuhan pada subjek yang menggunakan TAM.

Berbeda dengan hasil studi sebelumnya yang menunjukkan ada hubungan antara kadar END dan *hot flashes* ada beberapa studi yang menunjukkan hasil sebaliknya. Studi yang dilakukan oleh Irvin *et al.*¹⁰² menunjukkan tidak ditemukannya hubungan antara kadar END dan *hot flashes* pada awal terapi maupun setelah 4 bulan dilakukan peningkatan dosis. Studi yang dilakukan oleh Jager *et al.*¹⁰³ menunjukkan *hot flashes* bukan merupakan prediktor kadar serum TAM dan END. Studi tersebut menunjukkan terlihat adanya hubungan positif antara indeks massa tubuh yang tinggi dengan frekuensi ($p = 0,04$) dan beratnya *hot flashes* ($p < 0,0001$).

Salah satu efek samping END adalah penebalan dinding endometrium. Studi di Turki memperlihatkan pada penggunaan TAM 20 mg/hari terlihat adanya hubungan bermakna antara hiperplasia dinding endometrial dengan fenotip PM yang ditemukan pada alel *3/*4 CYP2D6 dan *6/*6 yang ditemukan pada 5,2% subjek ($p = 0,01$).¹⁰⁴ Hasil berbeda ditunjukkan pada studi yang dilakukan di Jepang, yang memperlihatkan tidak ada hubungan antara penebalan dinding endometrium dan alel *10/*10 CYP2D6, *wild-type/wild-type* CYP2D6, *wild-type*/*10 CYP2D6;

polimorfisme yang ditemukan adalah 15–20%¹⁰⁵ Studi lain menunjukkan risiko kanker endometrial meningkat dengan semakin lamanya penggunaan TAM secara bermakna dengan risiko relatif (RR)= 2; IK95% 1,2–3,2 pada penggunaan 2–5 tahun dan RR = 6,9; IK95% 2,4–19,5 pada penggunaan paling sedikit 5 tahun dibandingkan subjek yang tidak menggunakan TAM (dosis kumulatif lebih tinggi).¹⁰⁶

Penggunaan terapi TAM dihubungkan dengan meningkatnya risiko kejadian baru *fatty liver* sebesar 3,69 kali (HR = 3,69; IK95% 1,67–8,13) dan memperburuk *fatty liver* yang sudah ada sebesar 2,11 kali secara bermakna (HR = 2,11; IK95% 1,02–4,35).¹⁰⁷ Terlihat hubungan bermakna antara penggunaan TAM dan meningkatnya risiko diabetes melitus sebesar 1.31 kali secara bermakna pada penderita KPD yang mengkonsumsi TAM dibandingkan penderita yang tidak menggunakan TAM. (*adjusted* HR = 1,31; IK95% 1,19–1,45).¹⁰⁸ Masih belum diketahui secara pasti efek samping jangka panjang penggunaan TAM dosis 40–120 mg/hari, untuk itu masih dibutuhkannya studi jangka panjang yang menghubungkan pajanan TAM dan metabolitnya terhadap timbulnya efek samping.

2.4.1.5 Adherence dan Persistence

Aspek lain yang perlu diperhatikan dalam keberhasilan terapi TAM adalah *adherence* dan *persistence*. *Adherence* didefinisikan sebagai kepatuhan penderita dalam mengonsumsi obat yang diresepkan (dihitung dari *medication possession ratio* (MPR) $\geq 80\%$) dan *persistence* didefinisikan sebagai penghentian terapi dalam 180 hari. Studi menunjukkan sebanyak 31% subjek yang menggunakan terapi hormon menghentikan terapi, dan dari mereka yang meneruskan terapi sebanyak 28% *non-adherence*.²⁰ Hasil studi di atas juga menunjukkan penghentian terapi dini dan *non-adherence* merupakan prediktor independen mortalitas.²⁰

Tinjauan sistematis yang dilakukan oleh Murphy *et al.*¹⁰⁹ untuk melihat efek *adherence* dan *persistence* terhadap terapi hormonal pada penderita KPD di praktik klinis menunjukkan prevalensi *adherence* pada penggunaan TAM berkisar antara 41–88%. Prevalensi subjek yang menghentikan terapi TAM pada tahun pertama berkisar 15–20%, dan pada akhir tahun ke-5 adalah 31–60%.¹⁰⁹ Studi lain

menunjukkan penghentian terapi TAM lebih sering terjadi pada tahun pertama dan hanya $\pm 50\%$ yang menyelesaikan terapi selama 5 tahun.¹¹⁰

Banyak faktor yang dihubungkan dengan *non-adherence* dan *persistance* antara lain, usia ekstrem (lebih tua atau lebih muda), meningkatnya *out of pocket cost*, perawatan *follow up* ke dokter umum daripada ke ahli onkologi, aktivitas CYP2D6 lebih tinggi, perpindahan satu terapi ke terapi lain. Efek samping terapi tidak berhubungan dengan *adherence/persistence*. Penggunaan lebih banyak obat pada awal terapi, rujukan ke ahli onkologi, diagnosis pada awal tahun terapi juga dihubungkan dengan *adherence/persistence*.^{109,110} Selain faktor yang telah disebutkan di atas, aktivitas alel CYP2D6 dapat digunakan untuk memprediksikan kecenderungan untuk penghentian terapi TAM. Penderita dengan fenotip EM (alel fungsional) yang mempunyai fungsi CYP2D6 yang aktif memperlihatkan *adherence* yang rendah.¹¹¹

2.5. Endoksifen

2.5.1 Antiproliferatif Endoksifen (Studi *in vitro*)

Studi *in vitro* yang dilakukan oleh Wu *et al.*⁹⁸ menunjukkan END merupakan antiestrogen poten yang menyebabkan degradasi reseptor estrogen α (ER α) oleh proteasome dalam sel-sel KPD pada kadar tinggi (100–1000 nM/L), namun tidak terjadi pada kadar rendah (20–40 nM/L) seperti yang dijumpai pada subjek CYP2D6 PM. Selain itu END juga menghambat aktivitas transkripsi ER α dan menghambat proliferasi KPD yang diinduksi estrogen. END merupakan metabolit utama yang berperan dalam efektivitas TAM pada tatalaksana penderita dengan ER positif bersifat tergantung kadar END dalam darah.

Studi *in vitro* lainnya yang dilakukan oleh Wu *et al.*¹¹² memperlihatkan keberadaan ER β meningkatkan sensitivitas sel KPD terhadap efek antiestrogen END bersifat tergantung kadar (*concentration dependent*). END kadar rendah (20–40 nM/L) seperti yang diperlihatkan pada penderita dengan defisiensi aktivitas CYP2D6 menghambat kecepatan proliferasi sel KPD dengan keberadaan ER β melalui induksi ER α /ER β heterodimerisasi, semetara dibutuhkan kadar END lebih tinggi tanpa keberadaan ER β .

Hawse *et al.*¹¹³ memperlihatkan mekanisme kerja molekular END (interaksi ER α /DNA) berbeda dengan 4-OH-TAM. Efek antiestrogen END bergantung kadar. Peningkatan kadar END secara dramatis memengaruhi profil ekspresi gen, dan progresivitas pembelahan sel MCF7, dengan kadar tertinggi (1000 nM/L) memperlihatkan efek terbesar. Studi tersebut mendukung pendapat bahwa kadar END memengaruhi efek terapi TAM.

2.5.2 Polimorfisme CYP2D6 dan Respons Terapi

Berbagai studi telah dilakukan untuk melihat hubungan antara polimorfisme CYP2D6 dengan respons terapi. Beberapa studi besar dan metaanalisis memperlihatkan hasil yang masih bersifat kontradiksi. Pada *the BIG 1-98 trial*³⁶ dan *ATAC trial*³⁷ tidak ditemukan hubungan antara genotip CYP2D6 dan rekurensi KPD, namun kedua studi tersebut dikritik dalam kaitan dengan desain studi.¹¹⁴ Pada *the BIG 1-98 trial*³⁶ ditemukan adanya deviasi kuat *Hardy-Weinberg equilibrium* (HWE) sebagian disebabkan karena penggunaan teknik PCR dan penggunaan DNA somatik dari jaringan tumor KPD (daripada *germline* DNA) untuk *genotyping*. *ATAC trial*³⁷ dikritik karena mempunyai *power* statistik yang kecil karena kurang dari 19% (n = 588) penderita yang dirandomisasi untuk memperoleh TAM ikut dianalisis.

Sebaliknya, beberapa studi dan metaanalisis menunjukkan polimorfisme genetik CYP2D6 dapat menjadi prediktor respons terapi pada penderita KPD yang memperoleh terapi ajuvan TAM. *ABCSG 8 trial*³⁸ membandingkan pemberian TAM 5 tahun diikuti dengan anastrozole (inhibitor aromatase) memperlihatkan bila dibandingkan EM dan PM CYP2D6, maka PM CYP2D6 secara bermakna mempunyai angka rekurensi dan kematian lebih tinggi pada penderita yang memperoleh monoterapi TAM saja selama 5 tahun. Penderita yang mempunyai 2 alel PM mempunyai risiko 2,45 kali (OR = 2,45; IK95% 1,05–5,73; p = 0,04) mengalami rekurensi secara bermakna sementara penderita yang mempunyai 1 alel PM mempunyai risiko 1,67 kali (OR = 1,67; IK95% 0,95–2,93; p = 0,07) mengalami rekurensi secara bermakna.³⁸ Schroth *et al.*¹¹⁵ menemukan hasil yang sama pada studinya, yaitu penderita dengan aktivitas CYP2D6 yang kurang (mempunyai satu atau dua alel PM) secara bermakna mempunyai waktu rekurensi

yang lebih singkat masing-masing sebesar 1,4 kali (HR = 1,40; IK95% 1,04–1,90) dan 1,9 kali (HR = 1,90; IK95% 1,10–3,28). Selain itu bila dilakukan perbandingan antara subjek yang memiliki alel dengan fenotip EM dengan subjek yang memiliki alel PM homozigot maupun heterozigot, terlihat adanya perbedaan bermakna terhadap DFS (HR = 1,29; IK95% 1,03–1,61), namun tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna terhadap *overall survival* (OS) (HR = 1,15; IK95% 0,88–1,51).¹¹⁵

Metaanalisis oleh Jung *et al.*¹¹⁶ menunjukkan hasil meningkatnya risiko rekurensi secara bermakna pada penderita yang memiliki varian CYP2D6 sebesar 1,6 kali (HR = 1,60; IK95% 1,01–2,62) pada *random effect model implemented* dalam R dan 1,64 kali (HR = 1,64; IK95% 1,07–2,62) pada *non-random effect model implemented* (NONREM).

Metaanalisis ITPC³⁹ bertujuan untuk menjawab pertanyaan apakah *genotyping* CYP2D6 dapat dijadikan panduan dalam penggunaan TAM pada penderita KPD. Metaanalisis ITPC menunjukkan pada perempuan pascamenopause dengan ER+ yang memperoleh TAM 20 mg/hari selama 5 tahun (kriteria 1, n = 1996), status fenotip PM CYP2D6 dihubungkan dengan lebih pendeknya DFS sebesar 1,25 kali (HR = 1,25; IK95% 1,04–2,47; p = 0,009),³⁹ namun genotip CYP2D6 menjadi tidak bermakna secara statistik apabila tidak dilakukan penetapan lama terapi TAM, status menopause, *follow-up* rutin (kriteria 2), atau bila tidak diterapkannya eksklusi studi (kriteria 3) pada analisis statistik lanjut.

Hasil metaanalisis ITPC ini harus diinterpretasikan secara hati-hati karena bermakna ganda yaitu kriteria 1 memberikan bukti yang mendukung CYP2D6 sebagai biomarker yang penting bagi respons terapi dalam hal ini DFS, sementara kriteria 2 dan 3 menunjukkan tidak ditemukannya hubungan antara genotip CYP2D6 dengan DFS. Pada review yang dilakukan Goetz *et al.*^{117, 118} disebutkan ada banyak faktor yang berperan sebagai penyebab bervariasinya *outcome* studi TAM antara lain: (a). Kurangnya senter yang dapat melakukan pemeriksaan ER menyebabkan ada kemungkinan penderita dengan ER negatif ikut serta dalam terapi; (b). Penggunaan desain studi retrospektif seperti kohort menyebabkan terjadinya bias dalam ketersediaan spesimen tumor; (c). Ada variasi dalam lama

terapi TAM (2–5 tahun) dan dosis (20–40 mg/hari); (d). Faktor perancu yang diketahui dapat memengaruhi respon terapi berupa terapi tambahan dalam terapi KPD misalnya kemoterapi, inhibitor aromatase; (e). Tidak mempertimbangkan penggunaan inhibitor CYP2D6; dan (f). Asal *germline* untuk pemeriksaan *genotyping*.

2.5.3 Hubungan Kadar Endoksifen Plasma dan Respons Terapi

Murdter *et al.*¹¹⁹ menunjukkan kadar END terbesar ditemukan pada CYP2D6 fenotip UM (77 nM/L) dan EM (36,9 nM/L) dan terendah pada PM (9,9 nM/L) secara bermakna ($p = 10^{-16}$). Kadar END pada PM mencapai 25% dari kadar yang terukur pada subjek EM dan meningkat dengan bertambahnya jumlah alel fungsional. Hasil studi tersebut menunjukkan ada hubungan bermakna antara fenotip CYP2D6 dengan kadar END dalam darah.

Beberapa studi telah dilakukan untuk melihat hubungan antara kadar END dan respons terapi. Madlensky *et al.*¹⁷ menunjukkan kadar END yang tinggi yaitu di atas MTC (5,9 ng/mL atau 15,8 nM/L) mempunyai risiko 26% lebih rendah mengalami kekambuhan pada 1370 perempuan yang memperoleh TAM dengan rerata lama terapi 7,3 tahun pada *Women's Healthy Eating and Living (WHEL) trial*¹⁷ (HR = 0,70; IK95% 0,52–0,94). Selain itu, perempuan dengan fenotip PM, dan IM lebih sering mempunyai kadar END di kelompok kuartil bawah dan terlihat mempunyai risiko rekurensi yang lebih tinggi. Berdasarkan studi Madlensky *et al.*¹⁷ maka diambil *cut-off* kadar Z-END yang dapat memprediksikan rekurensi adalah sebesar 5,9 ng/mL. Saladores *et al.*¹²⁰ menunjukkan kadar Z-END yang rendah (< 14 nM atau 5,30 ng/mL) dihubungkan dengan lebih pendeknya DRFS 1,94 kali secara bermakna dibandingkan kadar tinggi (> 35 nM) (HR = 1,94; IK95% 1,04–4,14). Kedua studi tersebut menggunakan desain retrospektif dan menggunakan pendekatan a posteriori multiplikatif untuk mencari faktor-faktor yang dapat memprediksi risiko kekambuhan (genotip CYP2D6, prediksi aktivitas fenotip CYP2D6, kadar END, rasio metabolik, dan lain-lain). Studi yang dilakukan Love *et al.*¹²¹ menunjukkan rekurensi tidak hanya terjadi pada kadar END rendah, tapi juga terjadi pada kadar tinggi.

Studi yang dilakukan Love *et al.*¹²¹ menggunakan pendekatan a priori untuk melihat hubungan antara rekurensi dan kadar END menggunakan desain kasus kontrol. Hasil studi tersebut memperlihatkan hasil yang bertentangan dengan studi yang dilakukan Madlensky *et al.*¹⁷ dan Saladores *et al.*¹²⁰ Penderita yang mengalami kekambuhan mempunyai rerata kadar END lebih besar ($> 70\text{ng/mL}$) dibandingkan penderita yang tidak mengalami kekambuhan.¹²¹ Studi-studi tersebut menunjukkan diperlukannya rentang kadar optimal bagi END dalam menimbulkan respons terapi.

Beberapa studi dengan subjek etnik Asia telah dilakukan untuk melihat hubungan antara polimorfisme genetik CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan luaran klinis yang tidak konsisten. Penderita KPD di Thailand dengan genotip CYP2D6*10/*10 mempunyai kadar END yang lebih rendah dibandingkan dengan CYP2D6*1/*10 maupun CYP2D6*1/*1,³³ dan dihubungkan dengan lebih pendeknya *disease-free survival* (DFS) dibandingkan CYP2D6*10 heterozigot dan genotip lainnya ($p = 0,046$).³⁵ Studi yang dilakukan di Cina menunjukkan genotip CYP2D6*10 T/T mempunyai kadar 4-OH-TAM serum lebih rendah dan DFS yang lebih buruk 4,7 kali secara bermakna dibandingkan C/C atau C/T.¹²²

Studi lain yang dilakukan di Cina menunjukkan CYP2D6*10 T/T mempunyai kadar END paling rendah bila dibandingkan dengan genotip lainnya secara bermakna, dan hasil analisis subgrup menunjukkan penderita berusia di bawah 40 tahun dengan genotip T/T mempunyai (DFS dan OS lebih rendah dibandingkan genotip lainnya ($p < 0,01$)).³⁴ Ukuran tumor ($> 2\text{ cm}$) dan grade tumor merupakan faktor prognostik independen untuk DFS setelah dilakukan penyesuaian.³⁴ Studi yang dilakukan di Jepang menunjukkan CYP2D6*10/*10 secara bermakna mempunyai rekurensi lebih tinggi 16,63 kali setelah operasi dalam jangka waktu 10 tahun dibandingkan alel CYP2D6*1.¹²³ Genotip CYP2D6 dan ukuran tumor merupakan faktor independen yang memengaruhi *recurrence-free survival*.¹³⁸ Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh studi yang dilakukan Toyama *et al.*¹²⁴ menunjukkan tidak ada hubungan antara CYP2D6*10 dengan survival pada pasien KPD dengan nodus negatif yang memperoleh terapi adjuvan TAM.

2.5.4 Efek Peningkatan Dosis Tamoksifen terhadap Kadar Endoksifen

Beberapa studi telah dilakukan untuk melihat efek peningkatan dosis TAM

terhadap peningkatan kadar END plasma penderita yang diprediksi atau memiliki aktivitas genotip CYP2D6 yang berkurang atau pada penderita yang memiliki kadar END yang rendah sudah dilakukan sebelumnya. Ringkasan pustaka dari studi-studi yang melakukan peningkatan dosis TAM terhadap peningkatan kadar END dapat dilihat pada **Tabel 2.3**.

Tabel 2.3. Ringkasan Pustaka

Pengaruh (tahun)	Inklusi TAM 20 mg/hr (bulan)	Lama (bulan)	Endoksifen		Kesimpulan	Efek Sampling
			Baseline (ng/mL)	Pasca ↑dosis (ng/mL)		
Welzen <i>et al.</i> ¹³¹ (2014)	≥ 1	1	EM = 11,4 IM = 9,5 PM = 3,8	EM = - IM = 17,4 PM = 7,8	TAM 20→40 mg IM sebanding EM (11,4 mcg/L) PM < EM.	Tidak ada peningkatan
Kiyotani <i>et al.</i> ¹³² (2012)	≥ 1	1	Wt/Wt=19,7 Wt/V =15,9 V/V =9,3	Wt/Wt = - Wt/V = 22,4 V/V = 15,8	Wt/V = TAM 30 mg/hari V/V= 40 mg/hari meningkatkan END sebanding Wt/Wt (p = 0,076)	Tidak ada peningkatan
Dezentje <i>et al.</i> ¹³³ (2015)	≥ 2	2	IM =17,8 PM =8,0	IM=30,3 nM PM=27,3 nM	-semua mencapai MTC END 5,97 ng/mL (= 16,0 nM) - ↑TAM hingga 120 mg aman & tidak ↑ efek samping secara bermakna.	TAM 50 mg/hr (n = 1) tendennis grade 2 TAM 60 mg/hr (n =1): ≤ grade 2 TAM 100 mg/hr (n =1) perpanjangan interval QT bulan ke-2 (464 ms vs. 435) kembali normal minggu ke-2 dosis standar

Tabel 2.3 Ringkasan Pustaka

Pengarang (tahun)	Inklusi TAM 20 mg/hr (bulan)	Lama (bulan)	Endoksin		Kesimpulan	Efek Sampling
			Baseline (ng/mL)	Pasca ↑dosis (ng/mL)		
Jager <i>et al.</i> ¹⁹ (2014)	TAM 20 mg/hr TAM 10 mg/hr ≥ 2	9 (2-20).	MTC (Z)- END < 5,9 ng/mL TAM 10 mg/hr = 88% TAM 20 mg/hr = 22%	TAM 20mg/h r= 4,8 ng/mL TAM 30mg/hr = 9,11 TAM 40 mg/hr = 10,4	TAM 20 → 30/40 mg/hari ↑(Z)- END, (p < 0,001). 96% penderita mencapai MTC dg TAM 30 dan 40 mg/hari	Tidak ada perbedaan
Fox <i>et al.</i> ¹³⁴ (2016)	≥ 2	2	< 15nM = 24%	15 nM = 96% 30 nM = 69%	Kadar END rendah (bukan status metabolik CYP2D6) prediktor independen satu-satunya mencapai target END 15 nM (p = 0,04) & 30 nM (p = 0,003).	<i>hot flashes</i> (85%) Tidak ada hubungan END dengan skor <i>hot flash</i>

15 nM =
UM/EM/IM(100%)
PM (63%)

Tabel 2.3 Ringkasan Pustaka

Pengarang (tahun)	Inklusi TAM 20 mg/hr (bulan)	Lama (bulan)	Endoksifen		Kesimpulan	Efek Samping
			Baseline (ng/mL)	Pasca ↑dosis (ng/mL)		
Irvin <i>et al.</i> ¹⁰⁷ (2011)	≥ 4	4	EM = 34,3 IM = 18,5 PM = 4,2	EM = 29,2 IM = 21,8 PM = 12,9	TAM 40mg/hari (IM&PM) IM = EM (p=0,84) PM <EM (p=0,020)	Tidak ada peningkatan
Martinez de Dueñas, <i>et al.</i> ¹³⁵ (2014)	≥ 4	8	UM = 12,3 EM = 11,26 IM = 2,85 PM = 2,33	PM: TAM 40 mg/hari = 8,38 TAM 60 mg/hari = 9,30	TAM 40 = 60 mg/hari (p = 0,38) END pasca peningkatan dosis TAM 40 mg/hr (p = 0,13) & 60 mg/hari (p = 0,67) mendekati END (20 mg/hari)	Tidak ada perbedaan
Hertz <i>et al.</i> ¹³⁶ (2016)	≥ 4	4	UM / EM = 10 IM = 7,10 PM = 3,42	UM/PM = 9,3 IM = 10,74 PM = 5,52	TAM 40 mg/hari (IM & PM) Perbedaan kadar END selama terapi dapat di eliminasi dengan meningkatkan dosis TAM pada IM, namun tidak pada PM	Tidak ada peningkatan

2.5.5 Faktor Lain yang Memengaruhi Kadar Endoksifen dalam Plasma

Faktor - faktor yang dapat memengaruhi kadar END dalam darah antara lain: usia, indeks masa tubuh, variasi musim, waktu pemberian obat, interaksi obat. Semakin bertambah usia (usia tua) dihubungkan dengan semakin tingginya kadar serum END pada taraf mantap, dan semakin tingginya variasi interindividu.²¹ Kadar END lebih rendah pada subjek dengan indeks masa tubuh $> 24,4 \text{ kg/m}^2$ bila dibandingkan $\leq 21,5 \text{ kg/m}^2$.²² Musim dingin mengurangi kadar END sebanyak 20% dan juga dihubungkan dengan lebih rendahnya kadar vitamin D dalam darah.²³ Waktu konsumsi obat pada pagi hari meningkatkan pajanan sistemik END sebesar 15% (AUC_{0-24}) dibandingkan bila dikonsumsi malam hari.²⁴ Penggunaan TAM bersama obat yang dimetabolisme oleh enzim sitokrom P450 yang sama dapat memengaruhi kadar END dalam darah. Penggunaan TAM bersama penginduksi enzim rifampisin mengurangi kadar END sebanyak 28–85%.²⁵ Penggunaan antidepresan inhibitor poten CYP2D6 (fluoksetin, paroksetin) juga dapat mengurangi kadar END.²⁶

2.6. *Phenotyping* Aktivitas Metabolik CYP2D6

Aktivitas CYP2D6 dapat ditentukan dengan *genotyping*, namun *genotyping* saja tidak cukup untuk memprediksikan aktivitas CYP2D6 secara aktual karena banyak faktor yang dapat memengaruhi aktivitas CYP2D6 selain genetik. Untuk menentukan aktivitas enzim CYP2D6 secara aktual (*phenotyping*), diperlukan *probe drug* yang diberikan sebelum pengukuran obat maupun metabolit dari cairan tubuh. Beberapa *probe drug* yang telah digunakan untuk mengukur aktivitas CYP2D6 antara lain debrisoquin, spartein, DMP, metoprolol, dan tramadol.⁴¹ Debrisoquin dan spartein sudah tidak diproduksi di Indonesia.

Aktivitas CYP2D6 direfleksikan dengan mengukur parameter farmakokinetik melalui pengukuran *clearance* partial kadar *parent drug* terhadap kadar metabolit dalam cairan tubuh/ratio persentase dosis *parent drug* yang diekskresi dalam bentuk utuh terhadap persentase dosis *parent drug* yang diekskresi sebagai metabolit yang dinyatakan sebagai ratio metabolik (MR) yang diukur melalui cairan tubuh dengan menggunakan metode analitik kuantitatif, contohnya *high performance liquid*

chromatography (HPLC), atau *liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry* (LCMS/MS).

Ratio metabolik CYP2D6 dari *probe drug* akan memperlihatkan frekuensi distribusi bimodal atau bahkan trimodal, yang akan merefleksikan fenotip menjadi EM, (IM), dan PM.⁴¹ Saat CYP2D6 menjadi saturasi pada kadar substrat yang relatif rendah, dosis *probe drug* dengan sensitivitas tinggi akan tetap rendah sehingga akan mengurangi kejadian efek samping.¹³¹ Tanpa keberadaan inhibitor CYP2D6, semua substrat *phenotyping* merefleksikan tidak ada atau paling tidak adanya satu alel fungsional.

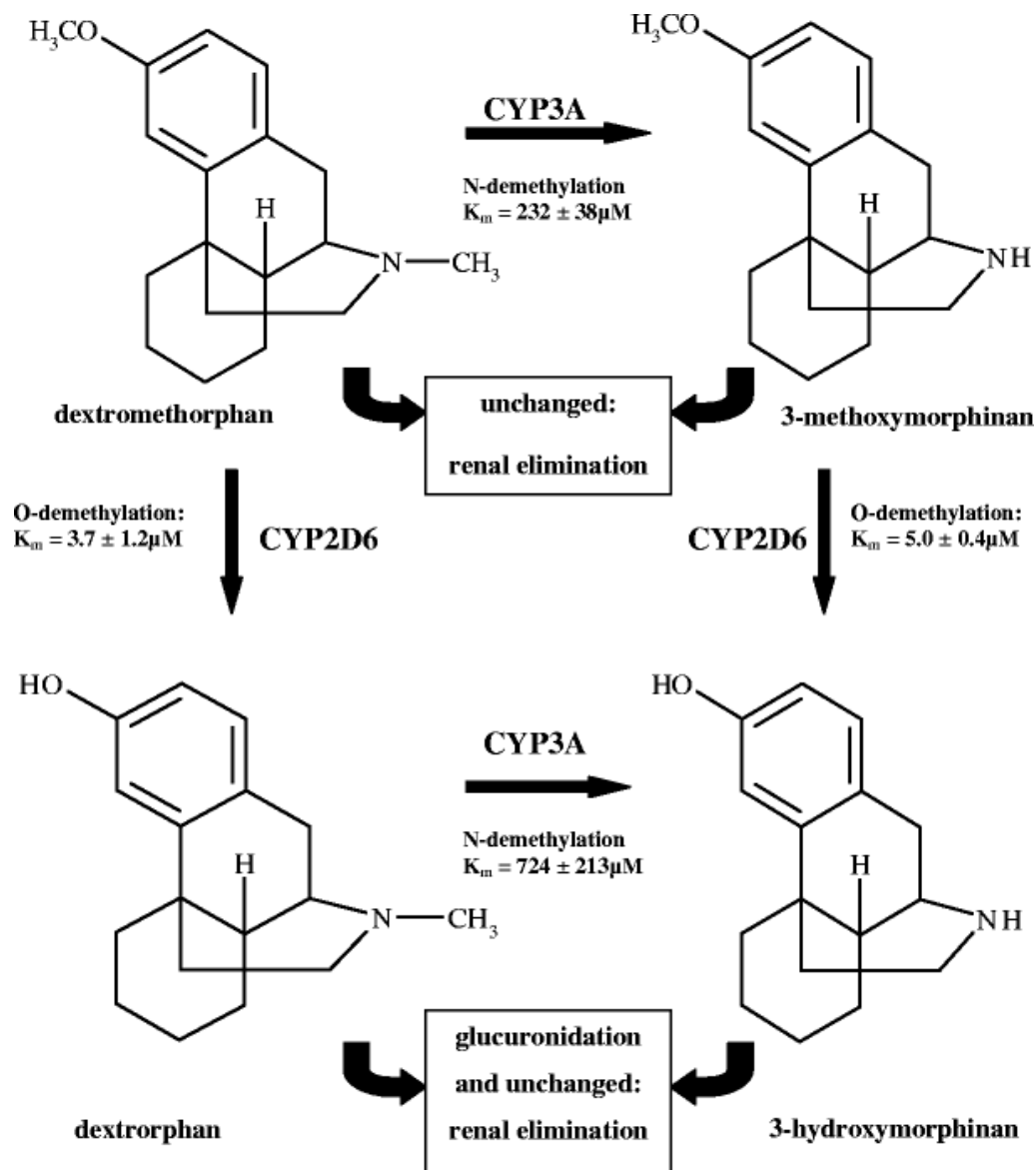
Definisi kriteria validasi *phenotyping* sitokrom CYP2D6: (a). Ada korelasi dengan *clearance* partial *parent drug*/metabolit yang diperantarai CYP2D6, (b). Reprodusibilitas (*coefficient of variation* rendah pada tes berulang); (c). Ada korelasi dengan AUC *parent drug* CYP2D6; (d). Ada korelasi dengan *probe drug* CYP2D6 lain yang telah tervalidasi (misalnya MR debrisoquin/4-dehidrodebrisoquin dalam urin 0-8 jam; DMP/dekstrofan dalam urin 0-24 jam; (e). Hasil merefleksikan polimorfisme genetik; (f). Independen pH urin dan fungsi ginjal; (g). Metode invasif yang rendah (risiko efek samping rendah, tidak memerlukan pengambilan darah); (h). Prosedur mudah bagi subjek; (i). Risiko kesalahan yang rendah saat pengumpulan sampel.¹³¹

Genotyping CYP2D6 saat ini banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas enzim CYP2D6, namun aktivitas metabolik CYP2D6 hanya dapat ditentukan dengan melakukan penilaian hasil tes *phenotyping* melibatkan obat spesifik (*probe drug*). Debrisoquin dan DMP merupakan obat terbaik untuk *phenotyping* aktivitas CYP2D6, namun karena ketersediaan debrisoquin yang sangat terbatas maka DMP merupakan *probe drug* yang banyak dipakai untuk *phenotyping* aktivitas metabolik CYP2D6⁴¹

2.6.1 Dekstrometorfan

Dekstrometorfan merupakan agonis reseptor opioid yang umumnya digunakan sebagai antitusif dengan dosis 15–30 mg/hari diminum 3–4x/hari. Farmakokinetik

DMP adalah sebagai berikut: setelah diberikan per oral DMP cepat diabsorpsi melalui saluran cerna dengan kadar pucak tercapai dalam 2–2,5 jam. Waktu paruh DMP berkisar 2–4 jam. Metabolisme DMP terjadi di hepar.¹³²



Gambar 2.15. Jalur Metabolisme Dekstrometorfan⁴¹

Jalur metabolisme DMP adalah sebagai berikut DMP dimediasi oleh O-demetilasi menjadi dekstrofan via CYP2D6, dan O-demetilasi menjadi 3-methoxymorphinan (3-MEM) via CYP3A4/5. 3-MEM dimetabolisme lebih jauh menjadi 3-hydroxymorphinan (3-OHM) oleh CYP2D6. DX dan 3-MEM dimetabolisme

lebih jauh dengan glukuronidasi dan kemudian dieliminasi via ginjal. DX juga dieliminasi oleh N-demetilasi via CYP3A4/5 menjadi 3-OHM (**Gambar 2.15.**).⁴¹ DMP dieliminasi melalui ginjal dalam bentuk utuh atau metabolit demetilasi. Dekstrofan merupakan metabolit aktif utama mempunyai waktu paruh 3,5–6 jam.¹³²

2.6.2 *Phenotyping* Menggunakan Dekstrometorfan

MR DMP/DX urin 8 jam banyak dipakai untuk membedakan fenotip EM dan PM.⁴¹ *Phenotyping* dengan mengukur sampel urin kurang invasif, namun tidak nyaman untuk pasien rawat jalan karena mesti menampung urin selama 8 jam. Ozdemir *et al.*¹³³ menunjukkan ada perbedaan sensitivitas *probe drug* untuk mengukur aktivitas CYP2D6 tidak hanya ditentukan oleh variasi genetik CYP2D6 tetapi juga oleh variasi derajat keasaman urin (pH) yang disebabkan oleh faktor makanan, perbedaan ras dalam ekskresi renal. Tanpa mengendalikan pH urin, pengukuran aktivitas metabolik CYP2D6 lebih sering tidak tepat menggunakan DMP maupun metoprolol sebagai *probe drug* dibandingkan debrisoquin.¹³³

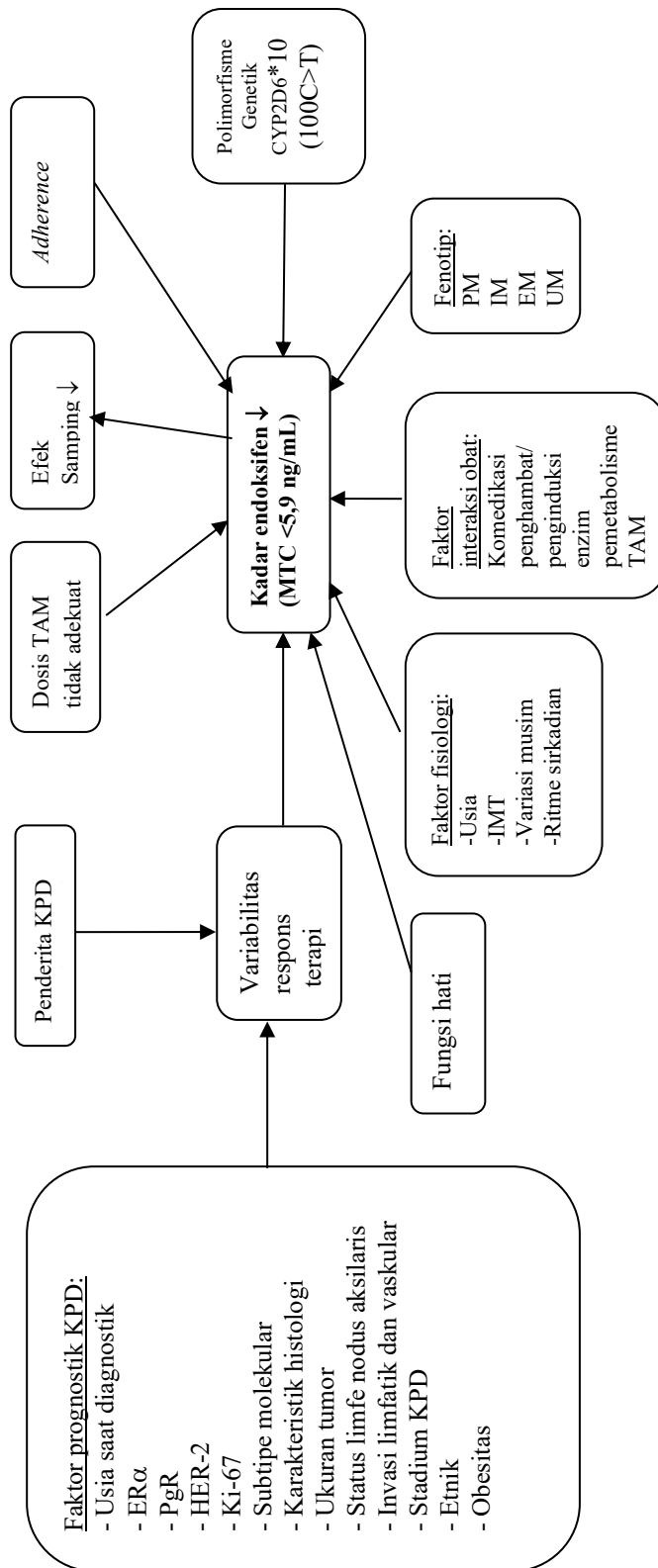
Metode *phenotyping* dengan menggunakan *one single point* plasma sampel telah dikembangkan. Ratio metabolik DMP terhadap DX (MR DMP/DX) yang diukur pada sampel plasma tunggal (3 jam pasca dosis) mengindikasikan korelasi yang kuat dengan MR DMP/DX yang diukur pada sampel urin (0–4 jam pasca dosis).¹³⁴

Studi de Graan *et al.*¹³⁵ menunjukkan pemberian DMP 30 dosis tunggal per oral yang diberikan 2 jam pasca TAM menunjukkan adanya korelasi yang kuat dan bermakna antara $AUC_{0-6 \text{ jam}}$ DMP dan kadar END ($r = -0,70$; $p < 0,001$).

Studi yang dilakukan Tamminga *et al.*⁴² menunjukkan bahwa MR DMP/DX plasma jam ke-3 cukup baik, dan berkorelasi dengan nilai $AUC_{0-12 \text{ jam}}$ secara bermakna ($r = 0,999$; $p = 0,000$). Antimode yang jelas membedakan antara fenotip berbeda antara etnik. Studi di Cina menunjukkan antimode fenotip PM dengan EM jelas terlihat pada nilai 2,0.¹³⁶ Studi di India menunjukkan fenotip PM = $MR DMP/DR < 1,39$, EM/IM = $MR DMP/DR > 1,39$.¹³⁷ Pengukuran MR DMP/DR plasma jam ke-3 merupakan alternatif yang baik dalam melakukan *phenotyping* aktivitas CYP2D6 enzim yang juga terlibat dalam metabolisme TAM.

2.7 Kerangka Teori

Penderita KPD yang mengkonsumsi TAM 20 mg/hari di klinik memperlihatkan variabilitas respons terapi. Banyak faktor yang menyebabkan bervariasinya respons terapi antara lain faktor prognostik. Beberapa faktor prognostik sudah diketahui dapat memengaruhi respons terapi KPD antara lain Usia saat diagnostik ER α , PgR, HER-2, Ki-67, sub tipe molekular, karakteristik histologi, ukuran tumor, status limfe nodus aksilaris, invasi limfatik dan vaskular, stadium KPD, etnik, dan obesitas. Selain itu variabilitas respons terapi TAM dapat juga disebabkan oleh kadar Z-END. Studi menunjukkan efek antiestrogen TAM bersifat *concentration dependent* sehingga dalam menimbulkan efek terapi diperlukan kadar Z-END di atas MTC 5,9 ng/mL. Banyak faktor penyebab variasi respons terapi antara lain dosis TAM yang tidak adekuat, faktor fisiologis (usia, indeks masa tubuh, variasi musin, ritme sirkadian (waktu minum obat), dosis TAM tidak adekuat, efek samping, *adherence dan persistence*, gangguan fungsi hati, interaksi obat (pemberian bersama penginhibisi atau penginduksi CYP2D6), fenotip, dan genotip CYP2D6. Pada **Gambar 2.16.** dapat dilihat kerangka teori studi ini.

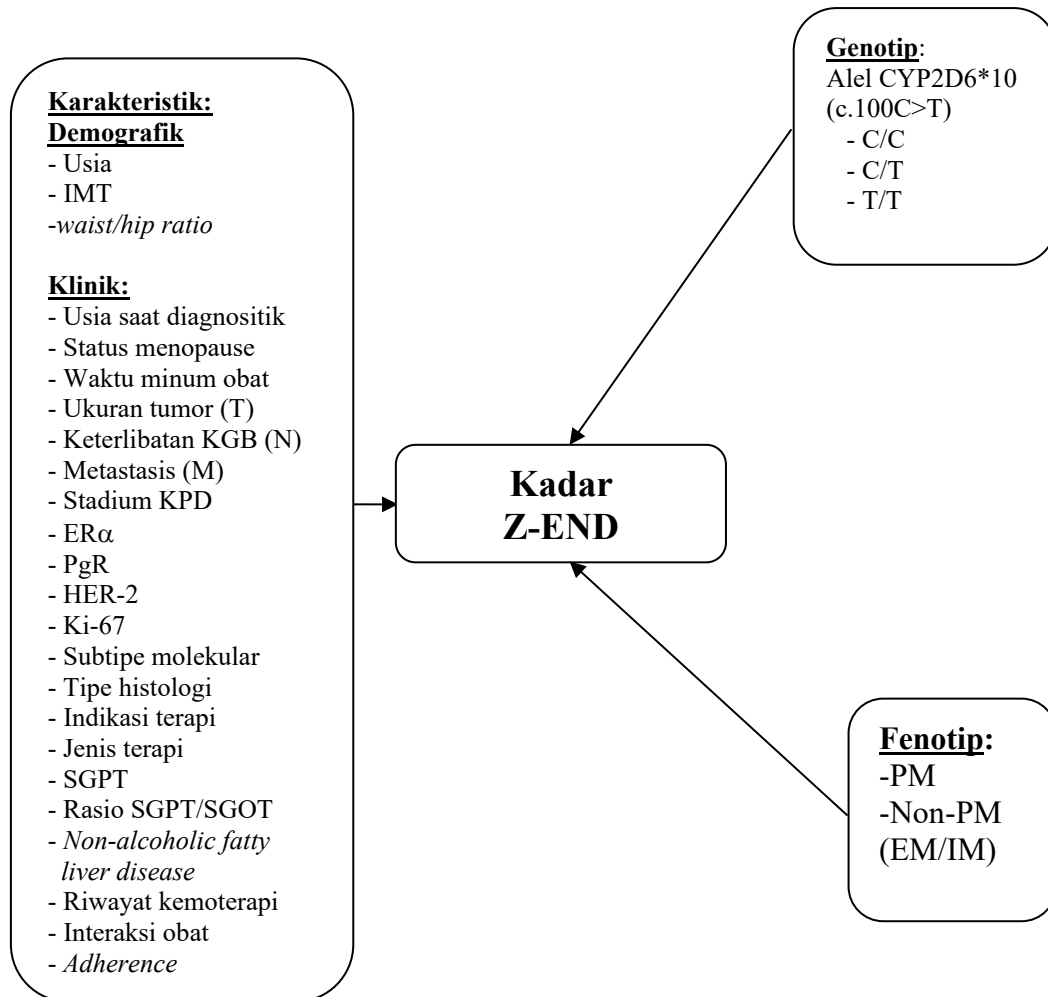


Gambar 2.16. Kerangka Teori Faktor-Faktor yang Berpengaruh terhadap Kadar Endoksifen

IMT= indeks massa tubuh, TAM=tamoksifen, KPD= kanker payudara, ERα= reseptor estrogen alfa, PgR= progesteron reseptor, HER-2= *human epidermal growth factor-2*, SGPT= *serum glutamic pyruvate transaminase*, SGPT= *serum glutamic oxaloacetic transaminase* CYP=sitokrom P450, END=endoksifen, PM=poor metabolizer, IM=intermediate metabolizer, EM=extensive metabolizer, UM=ultrarapid metabolizer. C/C= homozygot wild type, C/T= heterozygot mutan, T/T= homozygot mut

2.8 Kerangka Konsep

Studi ini bertujuan menentukan hubungan karakteristik demografik (usia, tinggi badan, berat badan, indeks massa tubuh, lingkar pinggang, lingkar pinggul, *waist/hip ratio*) dan klinik (usia saat diagnosis KPD, status menopause, lama terapi, waktu minum obat, ukuran tumor (T), keterlibatan kelenjar getah bening (N), metastatis (M), stadium KPD, ER α , PgR, HER-2, Ki-67, subtype molekular, tipe histologi, indikasi terapi, jenis terapi, kadar SGPT, rasio kadar SGPT/SGOT, *non-alcoholic fatty liver disease*, riwayat kemoterapi, interaksi obat potensial, *adherence*) dalam pencapaian kadar Z-END plasma. Studi ini juga akan menentukan hubungan genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) dan fenotip dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma. Pada **Gambar 2.17.** dapat dilihat kerangka konsep studi ini.



Gambar 2.17. Kerangka Konsep Hubungan Genotip CYP2D6*10 (c.100C>T), Fenotip, Karakteristik Demografik, dan Klinik dengan Pencapaian Kadar Z-END

IMT= indeks massa tubuh, TAM=tamoksifen, KPD= kanker payudara, ERα= reseptor estrogen alfa, PgR= progesteron reseptor, HER-2= *human epidermal growth factor-2*, SGPT= *serum glutamic piruvat transaminase*, SGOT= *serum glutamic oxaloasetic transaminase* CYP=sitokrom P450, PM=poor metabolizer, IM=intermediate metabolizer, EM=extensive metabolizer, UM=ultrarapid metabolizer. C/C= homozigot wild type, C/T= heterozigot mutan, T/T= homozigot mutan

BAB 3 METODE

3.1 Desain:

Jenis penelitian yang digunakan adalah analitik observasional dengan pendekatan rancangan potong lintang (*cross sectional*) yang digunakan untuk menjawab masalah dan mencapai tujuan penelitian.

3.2 Tempat dan Waktu:

RS. Kanker Dharmais (Jakarta), Oktober 2017– Februari 2018 (4 bulan)

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi Target

Penderita KPD rawat jalan yang memperoleh terapi TAM

3.3.2 Populasi Terjangkau

Penderita KPD rawat jalan yang memperoleh terapi TAM di RS. Kanker Dharmais dan beberapa RS. di luar RS.Kanker Dharmais antara lain: RSCM, RS.Pertamina, RS. Omni TB.Simatupang yang bersedia mengikuti protokol penelitian.

3.3.3 Subjek

Penderita KPD rawat jalan yang memperoleh terapi TAM di RS. Kanker Dharmais dan beberapa RS. di luar RS.Kanker Dharmais antara lain: RSCM, RS.Pertamina, RS. Omni Alam Sutera yang sudah mengonsumsi TAM minimal 4 bulan pada bulan Oktober 2017 berdasarkan data rekam medis.

3.4. Kriteria Seleksi

3.4.1 Kriteria Inklusi:

- Sudah mengonsumsi TAM selama terus menerus minimal 4 bulan
- Bersedia menandatangani *informed consent*

3.4.2 Kriteria Eksklusi

- Gangguan fungsi hati (*serum glutamic pyruvic transaminase* > 2,5 kali di atas nilai batas normal)

3.5 Besar sampel:

Perhitungan sampel dilakukan terhadap tujuan utama penelitian menggunakan data dari studi pendahuluan (*preliminary study*) menggunakan data dari 20 orang subjek studi.

- Estimasi besar sampel untuk tujuan diketahuinya persentase penderita KPD yang mencapai MTC Z-END (5,9 ng/mL) dalam plasma dengan dosis TAM 20 mg/hari pada saat *steady state*. dilakukan menggunakan **rumus proporsi tunggal**.

$$n = \left[\frac{Z\alpha \sqrt{\pi_0 (1 - \pi_0)} + Z\beta \sqrt{\pi_1 (1 - \pi_1)}}{\pi_0 - \pi_1} \right]^2$$

Keterangan:

n = jumlah subjek

$Z\alpha$ = simpang baku normal untuk α .

Untuk $\alpha = 0,05$, hipotesis 2 arah diperoleh $Z\alpha = 1,96$ (2 tailed)

$Z\beta$ = simpang baku normal untuk β (1 tailed)

Untuk $\beta = 0,2$ maka diperoleh $Z\beta = 0,842$

π_0 = proporsi subjek yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang mencapai MTC Z-END = 0,55

$(1 - \pi_0)$ = proporsi subjek yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari dan tidak mencapai MTC Z-END = 0,45

π_1 = proporsi yang diinginkan mencapai MTC Z-END = 0,41
(25% dari π_0).

$(1 - \pi_1)$ = proporsi subjek yang tidak dapat mencapai MTC Z-END yang tidak diinginkan = 0,59

$\pi_0 - \pi_1$ = perbedaan proporsi antara 2 kelompok

$$n = \left[\frac{1,96 \sqrt{0,55 \times 0,45} + 0,842 \sqrt{0,41 \times 0,59}}{0,55 - 0,45} \right]^2$$

$$n = \left[\frac{1,96 \sqrt{0,2475} + 0,842 \sqrt{0,2419}}{0,14} \right]^2$$

$$n = \left[\frac{0,975 + 0,414}{0,14} \right]^2$$

$$n = \left[\frac{1,384}{0,14} \right]^2$$

$$n = (9,9)^2$$

$$n = 98 \text{ orang}$$

Estimasi jumlah sampel yang dibutuhkan untuk mencapai tujuan di atas adalah sebesar 98 orang.

- Estimasi besar sampel untuk tujuan hubungan **genotip CYP2D6*10 (c.100C>T)** dalam pencapaian kadar **Z-END** dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD dilakukan menggunakan **rumus proporsi dua kelompok**.

$$n1 = n2 = \left[\frac{Z\alpha \sqrt{2 \times p1 (1 - p1)} + Z\beta \sqrt{p1 (1 - p1) + p2 (1 - p2)}}{p1 - p2} \right]^2$$

Keterangan:

$n1=n2$ = total jumlah subjek yang diperlukan masing-masing kelompok

$Z\alpha$ = simpang baku normal untuk α .

Untuk $\alpha=0,05$, hipotesis 2 arah diperoleh $Z\alpha = 1,96$ (2 tailed)

$Z\beta$ = simpang baku normal untuk β (1 tailed)

Untuk $\beta=0,2$ maka diperoleh $Z\beta = 0,842$

$p1$ = proporsi subjek dengan genotip non-T/T yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang mencapai MTC Z-END = 0,8

$(1 - p1)$ = proporsi subjek dengan genotip non-T/T yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang tidak mencapai MTC Z-END = 0,2

$p2$ = proporsi subjek dengan genotip T/T yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang mencapai MTC Z-END = 0,3

$(1 - p_2)$ = proporsi subjek dengan genotip T/T yang tidak dapat mencapai MTC Z-END yang tidak diinginkan = 0,7

$p_0 - p_1$ = perbedaan proporsi antar dua kelompok genotip.

$$n_1=n_2=\left[\frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,8 \times 0,2} + 0,842 \sqrt{0,81 \times 0,2 + 0,3 \times 0,7}}{0,8 - 0,3}\right]^2$$

$$n_1=n_2=\left[\frac{1,96 \sqrt{0,32} + 0,842 \sqrt{0,37}}{0,5}\right]^2$$

$$n_1=n_2=\left[\frac{1,1087 + 0,512}{0,5}\right]^2$$

$$n_1=n_2 = 3,24^2$$

$$n_1=n_2 = 10,49 = 11 \text{ orang}$$

Estimasi jumlah sampel yang dibutuhkan untuk mencapai tujuan di atas adalah sebesar 11 orang untuk masing-masing genotip.

- Estimasi besar sampel untuk tujuan hubungan **fenotip CYP2D6 terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada** pada saat *steady state* pada penderita KPD dilakukan menggunakan rumus **proporsi dua kelompok**.

$$n_1 = n_2 = \left[\frac{Z_{\alpha} \sqrt{2 \times p_1 (1 - p_1)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1 (1 - p_1) + p_2 (1 - p_2)}}{p_1 - p_2} \right]^2$$

Keterangan:

$n_1=n_2$ = total jumlah subjek yang diperlukan masing-masing kelompok

Z_{α} = simpang baku normal untuk α .

Untuk $\alpha=0,05$, hipotesis 2 arah diperoleh $Z_{\alpha}=1,96$ (2 tailed)

Z_{β} = simpang baku normal untuk β (1 tailed)

Untuk $\beta=0,2$ maka diperoleh $Z_{\beta}=0,842$

- p_1 = proporsi subjek dengan fenotip non-PM yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang mencapai MTC Z-END= 0,84
 $(1 - p_1)$ = proporsi subjek dengan fenotip non-PM yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang tidak mencapai MTC Z-END = 0,16
 p_2 = proporsi subjek dengan fenotip PM yang memperoleh terapi TAM 20 mg/hari yang mencapai MTC Z-END= 0,14
 $(1 - p_2)$ = proporsi subjek dengan genotip T/T yang tidak dapat mencapai MTC Z-END yang tidak diinginkan= 0,86
 $p_0 - p_1$ = perbedaan proporsi antar dua kelompok genotip= 0,7

$$n_1=n_2=\left[\frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,84 \times 0,16} + 0,842 \sqrt{0,84 \times 0,16 + 0,14 \times 0,86}}{0,84 - 0,14}\right]^2$$

$$n_1=n_2=\left[\frac{1,96 \sqrt{0,2688} + 0,842 \sqrt{0,2548}}{0,7}\right]^2$$

$$n_1=n_2=\left[\frac{1,016 + 0,425}{0,7}\right]^2$$

$$n_1=n_2 = 2,058^2$$

$$n_1=n_2 = 4,2 = 5 \text{ orang}$$

Estimasi jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 5 orang untuk masing-masing fenotip

3.6 Bahan dan Cara Kerja

3.6.1 Genotyping Gen CYP2D6*10 (c.100C>T)

3.6.1.1 Bahan dan Alat

Bahan

Sampel darah (*whole blood*) sebanyak 5 mL darah vena diambil dan disimpan dalam tabung yang mengandung *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), QiAamp DNA blood Mini Kit (QIAGEN) yang terdiri dari proteinase K, buffer AL,

buffer AE, buffer AW1, buffer AW2, QIAamp *Spin column* dan tabung koleksi (*collection tube*) 2 mL, mikropipet ukuran 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L, dan 2,5 μ L (Eppendorf), mikrotips biru, kuning, dan putih (Axygene), etanol absolut, *kim wipes*, *buffer* AE (QIAGEN), air bebas nuklease (QIAGEN), HotstarTaq Master Mix (QIAGEN), bubuk agarose (Bioron), tris borate EDTA (TBE), *ethidium bromide* (EtBr), kertas timbangan, *loading dye* 6x (Thermo Fisher Scientific), marker 50 bp (Thermo Fisher Scientific), silk, parafilm, enzim HphI (New England Biolabs), *cut smart buffer* 10x (New England Biolabs), *forward (F) primer* 5'-TCAACACAGCAGGTTCA-3' dan *reverse (R) primer* 5'-CTGTGGTTTCACCCACC-3' (Integrated DNA Technology), dan QIAquick Purification kit (QIAGEN) yang terdiri dari Qiaquick *spin column*, bufer PB, bufer PE, dan bufer EB.

Alat:

Spektrofotometer Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific), Thermal Cycler T100 (Bio Rad), Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem), *vortex mixer* (Thermolyne), *microcentrifuge/spindown* (LX-100), *sentrifuge* (Kit Man), *heat block* (Major Science), timer, tabung mikro 1,5 mL (Biologix), *isofreeze*, balok kuningan pendingin, timbangan analitik (Precisa 300A), spatula, labu erlenmeyer, perangkat gel elektroforesis (Takara), gel doc EZ Imager (Bio Rad), sisir (*comb*) dan cetakan gel agarose, microwave (Sanyo), gelas ukur, dan Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem).

3.6.1.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN).

Cara kerja:

Sebanyak 20 μ L proteinase K dipipet dan dimasukkan ke tabung mikro 1,5 mL. Tabung darah EDTA dibolak-balik sebanyak 4 hingga 5 kali untuk menghomogenisasi sampel darah. Sebanyak 200 μ L sampel darah ditambahkan ke dalam tabung 1,5 mL, kemudian diresuspensi menggunakan mikropipet. Setelah itu ditambahkan 200 μ L buffer AL. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks selama 15 detik dan diinkubasi pada suhu 56 °C selama 10 menit (*spindown*). Selanjutnya ditambahkan 200 μ L etanol absolut ke dalam tabung,

campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks selama 15 detik. Seluruh campuran kemudian dipindahkan ke dalam QIAamp *spin column* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Cairan *flowthrough* beserta tabung koleksinya (*collection tube*) dibuang kemudian *spin colum* diletakkan pada tabung koleksi yang baru.

Sebanyak 500 μ L buffer AW1 ditambahkan ke dalam QIAamp *spin column*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Cairan *flowthrough* beserta tabung koleksinya dibuang kemudian QIAamp *spin colum* diletakkan pada tabung koleksi yang baru. Sebanyak 500 μ L buffer AW2 ditambahkan ke dalam QIAamp *spin column*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Cairan *flowthrough* beserta tabung koleksinya dibuang kemudian QIAamp *spin colum* diletakkan kembali pada tabung koleksi. Setelah itu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit untuk menghilangkan sisa etanol.

QIAamp *spin column* lalu ditempatkan di tabung mikro 1,5 mL steril. Sebanyak 50 μ L buffer AE lalu ditambahkan tepat di tengah membran pada QIAamp *spin column*, lalu didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit agar larutan meresap dengan membran. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. QIAamp *spin column* dibuang, sampel DNA yang berada dalam tabung mikro 1,5 mL dihitung konsentrasi dan kemurniaannya dengan menggunakan Spektrofotometer Nano Drop 2000. Sampel DNA disimpan dalam *freezer* -20 °C untuk analisis selanjutnya. DNA yang digunakan adalah yang memiliki kemurnian DNA (rasio A260/A280 sekitar 1.8 dan rasio A260/A230 sekitar 2,0–2,2).

3.6.1.3 Polymerase Chain Reaction Gen CYP2D6*10

Untuk memperbanyak gen CYP2D6 dilakukan proses amplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)

Cara kerja:

Encerkan sampel DNA menjadi konsentrasi 25 ng/ μ L dengan menambahkan air bebas nuklease. Buat *master mix* PCR dengan komposisi per reaksi sebagai berikut air bebas nuklease 6 μ L, Hotstar Taq Master Mix 12,5 μ L, *primer forward* (10 μ M) 1,25 μ L, *primer reverse* (10 μ L) 1,25 μ L, sampel DNA (100 ng) 4 μ L, sehingga

didapatkan volume total 25 μL . Hitung volume masing-masing komponen PCR untuk membuat *master mix*. Perhitungan *master mix* PCR dilakukan dengan mengalikan setiap komposisi reaksi selain sampel DNA dengan jumlah sampel ditambah 1 reaksi NTC (*no template control*) dan angka 0,5 dalam perkalian untuk menghindari berkurangnya larutan *master mix* PCR. Setiap komposisi reaksi PCR dicampurkan sesuai dengan volume yang telah dikalikan ke dalam tabung 1,5 mL, kemudian dihomogenkan dengan diresuspensi menggunakan mikropipet. Sebanyak 21 μL larutan *master mix* PCR didistribusikan ke dalam masing-masing tabung PCR. Tambahkan 4 μL air bebas nuklease untuk 1 tabung NTC dan 4 μL sampel DNA untuk masing-masing tabung sampel. Kemudian divorteks dan *dispin down* agar seluruh cairan tercampur dan terjatuh ke bawah tabung.

Reaksi PCR dijalankan pada mesin *thermal cycler* dengan pengaturan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal (*initial denaturation*) pada suhu 95 °C selama 15 menit sebanyak 1 siklus, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 56 °C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 72 °C selama 30 detik (diulang 30 siklus), *final extension* pada suhu 72 °C selama 15 menit (1 siklus). Visualisasi produk PCR dengan melakukan elektroforesis menggunakan gel agarose 2,5%, 35 menit, 100 V.

3.6.1.4 Pembuatan Gel Agarose

Visualisasi produk PCR dan hasil digesti menggunakan gel agarose 2.5%.

Cara kerja:

Timbang 2,5 gram bubuk agarose pada timbangan analitik (Precisa), kemudian campurkan dengan buffer tris borat EDTA (TBE) 1x (yang telah dicampur *ethidium bromide*/EtBr) di dalam tabung erlenmeyer. Tutup tabung erlenmeyer dengan *silk* lalu ditusuk sebanyak 2 atau 3 kali untuk membuat lubang agar uap tidak terperangkap di dalam tabung. Masukkan tabung erlenmeyer ke dalam mikrowave (Sanyo) dengan pengaturan sebagai berikut: *power* = 450 Watt, *time* = 3 menit lalu tekan tombol start. Setelah itu, keluarkan tabung dari mikrowave lalu digoyangkan kuat agar larutan merata. Ulangi proses yang sama dengan waktu = 2,5 menit. Setelah selesai, keluarkan tabung erlenmeyer dari mikrowave. Tunggu suhu larutan turun (jadi hangat) sambil menggoyang-goyangkan tabung (agar larutan tidak

mengeras). Jika sudah hangat, segera tuangkan seluruh larutan ke dalam cetakan yang sudah dipasang sisir. Tunggu hingga gel agarose mengeras (± 30 menit). Jika sudah mengeras lepaskan sisir dan pindahkan gel beserta cetakannya ke *chamber* elektroforesis untuk dilakukan proses elektroforesis.

3.6.1.5 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk memvisualisasi produk PCR dan hasil digesti dengan enzim restriksi.

Cara kerja:

Masukkan gel agarose yang sudah mengeras ke dalam *chamber* elektroforesis yang telah berisi buffer TBE 1x (pastikan gel agarose terendam buffer TBE). Untuk elektroforesis produk PCR, campurkan 2 μL produk PCR dengan 1 μL *loading dye* 6x di atas lembaran parafilm menggunakan mikropipet, lalu campuran dipipet seluruhnya di dalam masing-masing sumur di gel agarose 2.5%. Untuk elektroforesis hasil digesti enzim restriksi, campurkan 20 μL produk hasil digesti dengan 4 μL *loading dye* 6x di atas lembaran parafilm menggunakan mikropipet, lalu campuran di pipet seluruhnya ke dalam masing-masing sumur gel agarose 2.5%. Sebagai marker elektroforesis hasil digesti, pipet 3 μL marker 50 bp (Thermo Fisher Scientific) ke dalam sumur gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan dengan mengatur voltase menjadi 100 V selama 35 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan gel doc (Bio Rad).

3.6.1.6 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan sebelum proses digesti dengan enzim restriksi guna mengoptimalkan kerja enzim restriksi dalam proses digesti.

Cara kerja:

Campurkan 1 volume produk PCR (23 μL) dengan 5 volume buffer PB (115 μL) kemudian resuspensi menggunakan mikropipet. Pindahkan seluruh campuran ke dalam Qiaquick *spin colum*, dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Buang cairan *flowthrough* dari tabung koleksi lalu kembalikan *spin colum* ke tabung koleksi. Tambahkan 750 μL bufer PE ke dalam *spin column* lalu sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Buang

cairan *flowthrough* lalu kembalikan *spin colum* ke tabung koleksi. Setelah itu sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pindahkan *spin column* ke tabung 1,5 mL steril. Tambahkan 30 μ L bufer EB ke dalam *spin column* tepat di tengah membran lalu diamkan selama 1 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Ukur konsentrasi dan kemurnian produk PCR hasil purifikasi menggunakan spektrofotometer Nano Drop 2.000.

3.6.1.7 Digesti Produk PCR dengan Enzim Restriksi

Genotyping alel CYP2D6*10 (100C>T) dilakukan menggunakan *polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) berdasarkan metode Bagheri *et al.*¹³⁸ Digesti produk PCR dengan enzim HphI dilakukan untuk menganalisa pola pemotongan yang dihasilkan untuk sampel dengan genotipe C/C (*wild type*), C/T heterozigot mutan, dan T/T homozigot mutan.

Cara kerja:

Persiapkan reaksi digesti dengan komposisi sebagai berikut: enzim HpHI 1 μ L, *cut smart buffer* 10 x 5 μ L, air bebas nuklease 19 μ L, produk PCR yang telah dipurifikasi (375–1.000 ng) 25 μ L sehingga didapatkan total volume 50 μ L. Campur larutan reaksi dengan meresuspensi larutan menggunakan pipet kemudian *dispindown* dengan mikrosentrifuge. Inkubasi campuran larutan reaksi pada suhu 37 °C selama 30 menit untuk mengaktivasi enzim HpHI dan inkubasi pada suhu 65 °C selama 20 menit untuk menginaktivasi enzim HpHI. Visualisasi hasil digesti produk PCR dilakukan dengan melakukan elektroforesis menggunakan gel agarose 2,5% dengan arus listrik 100 V, selama 35 menit

3.6.1.8 Sekuensing Gen CYP2D6*10 (c.100C>T)

Sekuensing gen CY2D6*10 dilakukan pada 3 sampel yang masing-masing mewakili genotip CY2D6 *wildtype* (C/C), homozigot mutan (T/T), dan heterozigot mutan (C/T) untuk mengkonfirmasi hasil PCR RFLP dan tipe mutasi yang terjadi pada daerah gen CYP2D6 yang dianalisis. Jika tidak ditemukan produk PCR menggunakan *primer* dari referensi Bagheri *et al.*¹³⁸ maka akan digunakan *primer* dari referensi Modaresi-nejad *et al.*¹³⁹ dengan *primer* sebagai berikut 5'-

GTCAACACAGCAGGTTCACTCAC-3' (*primer forward*) dan 5'-GTATAAATGCCCTTCTCCAGGAAGT-3' (*primer reverse*).

Proses sekuensing dilakukan di Bagian Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Kanker Dharmais menggunakan Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem). Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan *software* SeqScape. Hasil *sekuensing* dicocokkan dengan sekuens referensi gen CYP2D6 di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) dengan *accession number* M33388.

3.6.2 Pengukuran Kadar Z-endoksifen, Dekstrometorfan, dan Dekstorfan dalam Plasma

3.6.2.1 Bahan dan Alat

Pengukuran kadar Z-END, DMP, dan DX dalam plasma dalam plasma dilakukan secara simultan ditentukan dengan menggunakan *ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric* (UPLC-MS)

Bahan

(E/Z) *Endoxifen hydrochloride hydrate* (batch no. 145M4619V), *dextromethorphan HBr* (batch no. LRAA5631), dan *dextrophan tartrate* (batch no. 0000010551) dibeli dari Sigma-Aldrich. Standar internal Bisoprolol Fumarat (batch no. 00313007) sebagai standar internal dibeli dari Kolosal Pratama (Rusan Pharma). Semua bahan kimia memiliki level pada nilai analitis atau lebih tinggi. Asetonitril (HPLC *grade*), metanol (HPLC *grade*), dan asam format dibeli dari Merck (Kenilworth, NJ, USA). Blank plasma EDTA manusia dibeli dari Palang Merah Indonesia (Jakarta).

Alat (Spesifikasi)

Sistem UPLC/MS terdiri dari Sample Manajer UPLC Waters Aquity (Waters, Acquity BSM K08UP B 461M, Waters, Acquity SM K08UP A 050M), kolumn (Agilent PoroShell 120 EC-C₁₈ (1,7 µm) 2,1 mm x 50 mm yang digabungkan ke Waters TQ Detektor (Waters, TQD QBA 060). Kuantifikasi dilakukan dengan menggunakan Quanlynx seperti yang diterapkan pada perangkat lunak MassLynx V4.1. *Analytical balance* (Denver TB 215 D, Denver TB 413), mikropipet (Soccorex), *sentrifuge* (Hettich Rotofix 32 A, Hettich Micro 200), *vortex mixer*

(Barnstead, Thermoline Maxi Mix II), *Evaporator* (Turbo Vap LV), *Magnetic stirrer* (IKA).

3.6.2.2 Kondisi Kromatografi dan Spektrofotometri Massa

Analisis dipisahkan pada kolom Poroshell Agilent 120 EC-C18 (2,7 μ m) 2,1 mm x 50 mm pada laju alir 0,3 mL/ menit, temperatur kolom 35 °C, dengan fase isokratik asetonitril dan asam format 0.1% (40:60). Spektrometri massa tandem dilakukan pada mode ionisasi ion positif.

3.6.2.3 Penyiapan Larutan Kerja, Standar Kalibrasi, dan Sampel Kontrol Kualitas

Larutan induk untuk END, DMP, dan DX dilarutkan dalam asetonitril 50% pada masing-masing kadar sebagai berikut : 1000 μ g/mL, 1000 μ g/mL, dan 500 μ g/mL yang kemudian disimpan pada suhu 2–8 °C. Larutan kerja yang mengandung konsentrasi 5–500 ng/mL dari END, DMP, dan DX dilarutkan dalam 50% asetonitril dan disimpan pada suhu 2–8 °C yang akan digunakan selama validasi untuk standar kurva kalibrasi. Standar kurva kalibrasi dibuat dengan penambahan larutan kerja ke dalam blanko plasma manusia yang mengandung EDTA pada beberapa kadar berikut : 0,5, 2, 5, 10, 20, 30, and 50 ng/mL dari END, DMP, dan DX. Sampel kontrol kualitas (QC) disiapkan dalam plasma manusia yang mengandung EDTA pada konsentrasi 0,5 ng/mL (batas bawah kuantifikasi/ LLOQ), 1,5 ng/mL (*low QC*), 25 ng/mL (*medium QC*), dan 50 ng/mL (*high QC*) untuk END, DMP, dan DX.

3.6.2.4 Persiapan Sampel Plasma

Pada tabung mikro 2 mL yang berisi 0,4 mL plasma tambahkan 50 μ L larutan standar internal bisoprolol dengan konsentrasi 0,8 μ g/mL. Tambahkan larutan asam format 0,1% dalam asetonitril sebanyak 600 μ L. Selanjutnya, sampel di vortex selama 30 detik dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14000 rpm pada suhu kamar selama 5 menit. Fase organik dari hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam tabung gelas 10 mL dan kemudian diuapkan dengan nitrogen pada suhu 55 °C. Sisa penguapan dipekatkan kembali (rekonstitusi) dengan menambahkan larutan asam format 0,1% dalam asetonitril 50% sebanyak 300 μ L, vortex 20 detik. Setelah

direkonstitusi, sampel dipindahkan ke dalam botol 2 mL dan *aliquot* 15 μ L disuntikkan ke kolom UPLC/MS.

3.6.2.5 Validasi Metode Analisis UPLC-MS

Validasi metode UPLC-MS untuk pengukuran kadar END, DMP, dan dekstrofan dalam plasma mengikuti *European Medicine Agency (EMA) Guideline on bioanalytic method validation*. Beberapa parameter validasi metode bioanalitik yang penting untuk memastikan reliabilitas hasil pengukuran antara lain: selektivitas, *carry over*, akurasi dan presisi, *lowest limit of quantification* (LLOQ), kurva kalibrasi, *dilution integrity*, efek matriks, dan stabilitas analit dalam plasma dan internal standar dalam *stock* dan *working solution* selama periode penyimpanan dan pada saat pemeriksaan sampel.

3.6.2.5.1 Selektivitas

Parameter selektivitas dilakukan dengan membandingkan 6 sumber blanko plasma individual dibandingkan dengan blanko plasma yang ditambahkan analit dengan kadar terendah yang dapat terukur (LLOQ). Luas area analit kurang dari 20% dari area LLOQ dan luas area standar internal kurang dari 5%.

3.6.2.5.2 Carry Over

Parameter *carry over* dilakukan dengan menganalisa sample blanko yang diinjeksikan setelah konsentrasi penginjeksian sampel kadar tertinggi dari kurva kalibrasi (ULOQ). Kromatogram dari blanko sampel setelah injeksi ULOQ diletakkan di atas kromatogram LLOQ. Luas area analit dan internal standar yang terukur pada sampel blanko tidak boleh lebih dari 20% dari luas area pada LLOQ dan 5% dari luas area internal standar.

3.6.2.5.3 Lowest Limit of Quantification/ LLOQ

Parameter ini menunjukkan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat terukur yang memenuhi persyaratan akurasi dan presisi yaitu penyimpangan nilai kadar dan koefisien variasi tidak lebih dari 20%. LLOQ merupakan standar kalibrasi terendah. Sinyal analit dari sampel LLOQ paling sedikit 5 kali sinyal dari blanko plasma.

3.6.2.5.4 Kurva Kalibrasi/Linearitas

Sebelum melakukan validasi metoda analitik sebaiknya diketahui rentang konsentrasi yang diharapkan. Rentang konsentrasi ini harus bisa tercakup dalam rentang kurva kalibrasi yang meliputi LLOQ dan *upper limit of quantification* (ULOQ). Minimum 6 kadar berbeda digunakan untuk membuat kurva kalibrasi, blanko sampel (tanpa analit dan IS), dan *zero sample* (plasma dengan IS). Kurva kalibrasi diperoleh dari rasio luas area analit dan IS dengan konsentrasi larutan standar. Standar kurva kalibrasi dibuat dengan penambahan larutan kerja ke dalam plasma *blank* manusia yang mengandung EDTA pada beberapa konsentrasi berikut : 0,5, 2, 5, 10, 20, 30, and 50 ng/mL dari END, DMP, dan DX. Perhitungan kembali kadar analit pada larutan standar kalibrasi tidak lebih dari 15%, kecuali LLOQ tidak lebih dari 20%.

3.6.2.5.5 Akurasi dan Presisi

Akurasi metoda bioanalitik mendeskripsikan kedekatan nilai yang didapat dari metode pengukuran dengan kadar analit (%). Akurasi harus dinilai dari sampel yang di-*spike* dengan analit dengan jumlah yang sudah diketahui, *quality control sample* (QC samples), dan dilaporkan dalam persentase dari nilai nominal.

Presisi metoda analitik mendeskripsikan kedekatan hasil pengukuran individual saat dilakukan pengukuran berulang-ulang. Presisi diekspresikan sebagai *coefficient of variation* (CV). Akurasi dan presisi harus diperlihatkan pada LLOQ, *low*, *medium*, dan *high* QC sampel dalam satu hari (*within run*) dan hari yang berbeda (*between run*) paling sedikit selang 2 hari. Penilaian akurasi dan presisi dilakukan dengan mengukur pada 4 kadar yang berbeda sebanyak 5 kali pengukuran untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi 0,5 ng/mL (LLOQ), 1,5ng/mL (*low* QC), 25 ng/mL (*medium* QC), dan 50 ng/mL (*high* QC) untuk END, DMP, dan DX. Hasil pengukuran konsentrasi tidak boleh lebih dari 15% untuk sampel QC dan 20% untuk LLOQ pada parameter akurasi, serta koefisien variasi tidak boleh lebih dari 15% untuk sampel QC dan 20% untuk LLOQ pada parameter presisi.

3.6.2.5.6 Efek Matriks

Parameter *matrix factor* (MF) dihitung dengan dilakukan dengan membandingkan rasio luas area analit dalam matriks dan tanpa matriks (murni larutan analit). IS *normalised* MF dihitung dengan membagi MF dengan MF dari IS dengan

menggunakan 6 sumber yang berbeda pada konsentrasi tinggi dan rendah (maksimal 3 kali pada LLOQ dan mendekati ULQC). Koefisien variasi dari IS-*normalized* MF pada keseluruhan konsentrasi di bawah 15%.

3.6.2.5.7 Stabilitas

Evaluasi stabilitas harus dilakukan pada tiap langkah metoda analitik mulai dari preparasi sampel, analisis, dan kondisi penyimpanan untuk memastikan bahwa konsentrasi analit tidak dipengaruhi. Uji stabilitas dilakukan pada 3 tahap yaitu *short term stability*, *post preparative stability*, dan *long term stability*. *Short term stability* dilakukan dengan menyimpan QC konsentrasi rendah dan tinggi pada temperatur ruang selama 0, 3, 6, dan 24 jam. Nilai deviasi konsentrasi yang terukur pada uji stabilitas tidak lebih dari 15% dari konsentrasi awal. *Post preparative stability* dilakukan dengan meletakkan QC konsentrasi sampel dalam autosampler selama 0, 6, 12, dan 24 jam. Nilai deviasi konsentrasi yang terukur pada uji stabilitas tidak lebih dari 15% dari konsentrasi awal. *Long term stability* dilakukan dengan menyimpan QC konsentrasi rendah dan tinggi dalam sel darah merah pada temperatur beku (maksimum -20 °C) selama 0, 2, 17, dan 44 hari. Nilai deviasi konsentrasi yang terukur pada uji stabilitas tidak lebih dari 15% dari konsentrasi awal.

3.6.2.5.8 Integritas Dilusi (*Dilution Integrity*)

Dilusi sampel tidak boleh memengaruhi akurasi dan presisi. Integritas dilusi dilakukan dengan menambahkan analit pada konsentrasi di atas ULOQ (konsentrasi di atas 50 ng/mL) blank plasma kemudian dilakukan dilusi dengan *blank* plasma. Akurasi dan presisi tidak lebih dari 15%.

3.7 Variabel Penelitian

3.7.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

- Karakteristik subjek studi:

Karakteristik demografik:

Usia, indeks massa tubuh, *waist/hip ratio*.

Karakteristik klinik:

Usia saat diagnosis, status menopause, waktu minum TAM, ukuran tumor, keterlibatan kelenjar getah bening, metastasis, stadium KPD, ER, PgR, HER-2, Ki-67, sub tipe molekular, tipe histologi, indikasi terapi, jenis terapi, interaksi obat, kadar SGPT, rasio kadar SGPT/SGOT, non-alcoholic fatty liver disease, riwayat kemoterapi, dan *adherence*.

- Genotip alel CYP2D6*10 c.100C>T (T/T dan non-T/T)
- Fenotip CYP2D6 (PM dan non-PM)

3.7.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar Z-END dalam plasma.

3.8 Definisi Operasional

Pada **Tabel 3.1** dapat dilihat definisi operasional dari berbagai variabe

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Usia	Lama hidup subjek sejak dilahirkan sampai saat wawancara dilakukan. Ditentukan berdasarkan hari ulang tahun terakhir	KTP	Wawancara	Lansia (≥ 60 tahun) ¹⁴⁶ Bukan lansia (< 60 tahun)	Ordinal
IMT	Rasio standar berat (kg) terhadap tinggi badan (m) kuadrat pada saat penelitian.	Microtoise (stature meter), ketelitian 0,1 cm. Timbangan berat badan SECA dari UNICEF Ketelitian 0,1 cm	($IMT = BB(kg)/TB(m^2)$) Tinggi badan: Alat ukur diletakkan pada bidang datar dan bersandar pada dinding. Subjek penelitian diminta untuk melepaskan alas kaki dan asesoris rambut. Belakang kepala, pundak, bokong, dan tumit menyentuh papan. Posisi tangan lurus ke bawah, berada di sisi badan. Subjek diminta untuk relaksasi, pandangan lurus ke depan, serta ujung telinga dan sudut mata sejajar dengan lantai. Bagian alat yang bergerak diturunkan perlahan hingga menyentuh bagian atas dari kepala dan terus diturunkan hingga rambut tertekan. Pengukuran tinggi badan dilakukan dua kali, dan nilai yang diambil adalah nilai rerata dari kedua pengukuran tersebut.	WHO/IASO/IOTF. <i>The Asia-Pacific perspective</i> . ¹⁴⁷ Berat badan kurang-normal ($< 22,9$) Berat badan lebih ($23-24,9$)– obesitas ($25 \geq 30,0$)	Ordinal

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Berat badan:					
			Penimbangan dilakukan sebelum subjek penelitian makan dan subjek diminta untuk buang air kecil dulu. Alat timbang diletakkan dipermukaan lantai yang rata dan keras dan skala harus menunjukkan berat 0 kg. Subjek diminta untuk berdiri di tengah-tengah timbangan dengan berdiri tegak tanpa menggunakan alas kaki atau kaus kaki dan menggunakan pakaian seminimal mungkin. Posisi tubuh subjek adalah berdiri tegak, kedua tangan relaksasi disamping tubuh, kepala ditegakkan dan pandangan lurus ke depan. Pasien diminta untuk tidak bicara dan bergerak sampai hasil pengukuran keluar.		
Waist/hip ratio	Rasio lingkaran pinggang (cm) terhadap lingkaran pinggul (cm)	Meteran kain Ketelitian 0,1 cm	<u>Lingkar pinggang</u> Pengukuran dilakukan dalam kondisi puasa dan menggunakan pakaian yang minim. Subjek diminta berdiri tegak dengan abdomen rileks, kedua lengan pada samping badan dengan kedua kaki dirapatkan. Tentukan iga paling bawah dengan ujung bolpoint. Raba krista iliaka pada pertengahan garis mid-aksilaris dan tandai dengan bolpoint. Pita kain dilingkarkan secara horizontal pada pertengahan antara iga paling bawah dan lateral krista iliaka sampai ujung pita bertemu.	Normal (< 0.82) Tinggi/obesitas abdominal (≥ 0.82)	Ordinal

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
			Angka yang didapat merupakan lingkaran pinggang subjek. Pengukuran LP dilakukan dua kali dan nilai yang diambil adalah nilai rerata dari kedua pengukuran tersebut		
			<u>Lingkar pinggul</u> Subjek berdiri tegak dengan kedua lengan pada sisi tubuh dan kaki dirapatkan. Lingkarkan pita kain pada tempat yang menghasilkan lingkaran maksimum pada pantat (hanya menyentuh kulit namaun tidak sampai menimbulkan indentasi pada jaringan lunak)		
Waktu minum TAM	Waktu pasien mengkonsumsi	Rekam medis	Wawancara	Bukan malam Malam (19.00–24.00 WIB)	Nominal
Status menopause	Status menopause subjek pada saat diagnosis KPD ditegakkan	Rekam medis	<u>Premenopause</u> (perempuan yg masih menstruasi secara teratur tanpa menggunakan kontrasepsi oral atau terapi sulih hormon)	Premenopause ¹² Pascamenopause	Ordinal

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
			Pascamenopause (umur kurang dari 60 tahun, tidak menggunakan kontrasepsi oral atau terapi sulih hormon dengan diketahui mempunyai uterus yang intak dan tidak menstruasi paling sedikit 1 tahun sebelum terdiagnosis kanker payudara, dilakukan pengangkatan operasi pengangkatan ovarium sebelumnya)		
Tumor	Ukuran tumor dalam centimeter pada saat didiagnosis	USG/mamografi awal diagnosis (sebelum operasi)/ hasil patologi anatomi pascaoperasi	Wawancara	<i>American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Breast.</i> ⁶⁶ < 2 cm ≥ 2 cm	Ordinal
Nodul	Keterlibatan kelenjar bening	USG/mamografi awal diagnosis (sebelum operasi)/ hasil patologi anatomi pascaoperasi	Wawancara	AJCC Staging of Breast. ⁶⁶ 0 ≥ 1	Ordinal

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Metastasis	Ada atau tidaknya metastasis jauh	Hasil pemeriksaan penunjang (Rotgen thorax, USG, bonescan atau lainnya)	Wawancara	AJCC <i>Staging of Breast</i> . ⁶⁶ Ya Tidak	Ordinal
Stadium KPD	Pentuan stadium saat awal diagnosis	KPD pada awal diagnosis (sebelum operasi) hasil patologi anatomi pascaoperasi	Ditentukan berdasarkan besar tumor primer (T), keterlibatan kelenjar getah bening regional (N), ada atau tidaknya metastasis jauh (M)	AJCC <i>Staging of Breast</i> . ⁶⁶ Stadium dini (0, I, IIA & IIB) Stadium lanjut lokal (IIIA,B, C)– lanjut (IV)	Ordinal
ER	Reseptor estrogen	Imunohistokimia terhadap hormon	Mengidentifikasi ekspresi ER terhadap estrogen	<i>American Society of Clinical Oncology (ASCO) /College of American Pathologists (CAP) guideline</i> . ¹⁴⁸ Positif (ER ≥1%) Negatif (ER <1%)	Ordinal
PgR	Reseptor progesteron	Imunohistokimia terhadap hormone	Mengidentifikasi ekspresi PgR terhadap progesteron	ASCO/CAP <i>guideline</i> . ¹⁴⁸ Positif (PgR ≥1%) Negatif (PgR <1%)	Ordinal

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur ¹⁴⁸	Skala ukur
KI-67	Protein inti non-histon sebagai marker proliferasi sel KPD	Imunohistokimia	Mengidentifikasi ekspresi protein non histon	ASCO/CAP guideline, ¹⁴⁸ Rendah (< 20%) Tinggi (≥ 20%)	Ordinal
HER2	Ekspresi oncoprotein c-erbB2 yang diklasifikasikan: positif di grade 0, 1, 2, dan 3	Imunohistokimia	-Grade 0: tidak ada reaktivitas membran. -Grade +1: pewarnaan membran <10% -Grade +2: pewarnaan membran lengkap yang lemah—sedang di >10% dari sel-sel tumor invasif dengan uji CISH/FISH tidak memperlihatkan amplifikasi. Catatan: grade +2 perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan dengan uji CISH/FISH untuk menentukan apakah dikategorikan HER2 positif atau negatif. -Grade 3: pewarnaan membran lengkap menunjukkan hasil yang kuat di >10% dari sel-sel tumor invasive.	ASCO/CAP guideline,¹⁴⁸ HER2 negatif: Grade 0—grade +2 HER2 positif: Grade +3 dan grade +2 dengan uji CISH/FISH menunjukkan amplifikasi Meragukan: Pada grade +2 yang tidak dilanjutkan dengan uji CISH/FISH	
Subtipe molekular intriksi/clinico patologic	Penentuan KPD dengan menggunakan antibody sebagai probe untuk mendeteksi antigen dalam potongan jaringan/bentuk preparasi sel lainnya sebelum memulai terapi hormone.	Imunohistokimia	Mengidentifikasi ekspresi ER, PgR, HER2, dan peningkatan antigen Ki-67. ER: reseptor hormon terhadap estrogen ER+: ≥1% pewarnaan inti ER-: <1% pewarnaan inti PgR: reseptor hormon terhadap progesteron. PgR+: ≥1% pewarnaan inti PgR-: <1% pewarnaan inti	<i>The St.Gallen International Expert Consensus.</i>⁹ Luminal A/luminal A like. (ER+, PgR+, HER2-, Ki-67 rendah) Non-luminal A: -Luminal B/ Luminal B-like (HER2+)	

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
			HER2/ncu: ekspresi onkoprotein c-erbB2 yang diklasifikasikan: positif di grade 0,1,2, dan 3. Ki-67: protein inti non-histon sebagai marker proliferasi sel KPD Ki-67 tinggi: $\geq 20\%$, Ki-67 rendah: $< 20\%$	(ER+, overexpression/amp lifikasi HER2, apapun Ki-67, apapun PR) -Lainnya: Overekspresi Erb-B2/ HER2+ nonluminal (ER-, PgR-, HER2+) -Basal like/ triple negatif (duktal) (ER-, PgR-, HER2-)	
Tipe histologi	Diagnosis patologi anatomi pada saat diagnosis ditegakkan	Rekam medis	Patologi anatomi	<i>World Health Organization Classification of Tumors of the Breast</i> . ¹⁴⁹ NST (invasif carcinoma of no special type) Lainnya	Ordinal
Indikasi terapi TAM	Indikasi pemberian TAM saat pengambilan data	Rekam medis	Adjuvan (terapi yang diberikan sebagai tambahan terapi utama) Primer (pada KPD metastasis jauh)	PERABOL ¹² Adjuvan Primer	Ordinal
Jenis Terapi		Rekam medis	Wawancara	PERABOL . ¹² Tamoksifen Tamoksifen + lainnya	Nominal

Tabel 3.1 Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Interaksi obat potensial	Obat-obat yang dikonsumsi bersama TAM saat pengambilan data	Rekam medis	Ada (bila obat yang dikonsumsi bersama TAM dimetabolisme oleh enzim CYP-p450 yang serupa dengan yang memetabolisme TAM) Tidak	Ada Tidak	Nominal
Adherence (Compliance)	Kepatuhan subjek studi dalam mengkonsumsi TAM	Kuesioner	Terdiri dari 8 pertanyaan yang masing-masing jawaban mempunyai skor. Total skor menunjukkan tingkat kepatuhan pasien.	<i>Morisky medication adherence scale-8 (MMAS-8)</i> Kepatuhan tidak tinggi (skor < 8) Kepatuhan tinggi (skor ≥ 8)	Ordinal
SGPT	Nilai fungsi hati yang diukur saat pengambilan data atau dalam rentang waktu 6 bulan dari saat pengumpulan data	Spektrofotometer	Hasil pemeriksaan SGPT dari laboratorium RS, Kanker Dharmais	Normal (0–32 U/L) Tinggi (> 32 U/L)	Ordinal
Rasio SGPT/SGOT	Rasio kadar enzim hati yang diukur saat pengambilan data atau dalam rentang waktu 6 bulan dari saat pengumpulan data	Spektrofotometer	Rasio kadar SGPT/SGOT dari laboratorium RS, Kanker Dharmais/RS lainnya	Normal (< 1) Tinggi (≥ 1)	Ordinal
Riwayat kemoterapi	Riwayat penggunaan kemoterapi sebelumnya	Rekam medis	Catatan penggunaan kemoterapi	Tidak Ya	Nominal

Tabel 3.1. Sambungan

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Non-alcoholic fatty liver disease	Ditemukannya gambaran <i>fatty liver</i> pada pemeriksaan USG hepar	Ekspertise hasil USG hepar	Ekspertise hasil USG hepar subjek studi	Tidak Ya	Nominal
Genotip	Identifikasi <i>single nucleotida polymorfisme</i> (variasi 1 pasang basa) pada alel CYP2D6*10 (c100C>T) pada exon 1 yang menyebabkan substitusi asam amino prolin menjadi serin (Pro34Ser)	PCR-RFLP	Mengidentifikasi ada atau tidaknya substitusi nukleotida (c100C>T)	Non-T/T (C/C, C/T) T/T	Ordinal
Fenotip	Fenotip dinilai dengan menghitung ratio metabolik <i>probe drug</i> deksametorfan dan metabolitnya deksametorfan (MR DMP/DEX) yang dihitung 3 jam pasca mengkonsumsi DMP (30 mg) per oral	UPLC-MS/MS	Berdasarkan MR DMP/DX ditentukan area kurva (<i>receiver operating character</i>) ROC, di mana 0.5 mengindikasikan tidak ada diskriminasi, dan area 1.0 mengindikasikan diskriminasi sempurna. Penentuan <i>cut off point</i> PM dan non-PM berdasarkan nilai sensitivitas dan spesifisitas koordinat kurva ROC yang sama besarnya. ($\pm 85\%$).	NonPM (< 1.01) PM (≥ 1.01)	Ordinal
Z-END	Kadar Z-END plasma yang diukur pada saat <i>steady state</i> (± 4 bulan) pasca konsumsi TAM 20 mg/hari	UPLC-MS/MS	Kadar Z-END diidentifikasi dalam plasma berdasarkan rasio M/Z 374,25 > 58,11	< MTC (< 5,9 ng/mL) $\geq$ MTC ($\geq 5,9$ ng/mL)	Ordinal

3.9 Alur Kerja Studi

Pada awal studi untuk mengetahui apakah sampel penelitian mencukupi atau tidak, dilakukan identifikasi pasien-pasien rawat jalan yang menggunakan TAM dari 1 Januari 2017 hingga 31 Juli 2017 di Rumah Sakit Kanker Dharmais. Berdasarkan data permintaan obat TAM di farmasi tercatat ada 265 pasien yang mengonsumsi TAM minimal 4 bulan. Setelah lolos kaji etik penelitian dari FK.UI dan RS.Kanker Dharmais diperoleh, dimintakan surat izin lokasi penelitian dan dilakukan penandatanganan *material transfer agreement* (MTA) dengan RS.Kanker Dharmais sebelum perekrutan subjek studi dilakukan.

Subjek studi diidentifikasi dari poli rawat jalan Polionkologi 2 RS.Kanker Dharmais pada saat kunjungan ke rumah sakit. Bagi subjek yang memenuhi kriteria perekrutan subjek akan dicatat nama, nomor rekam medis, dan nomor telepon yang bisa dihubungi (Lampiran 4.). Subjek akan diminta kesediaannya untuk ikut serta dalam penelitian secara langsung pada saat kunjungan ke rumah sakit atau dihubungi melalui telepon bila tidak dapat ditemui saat kunjungan ke rumah sakit. Sebelum dilakukan pengumpulan data, kepada subjek terlebih dahulu diberikan penjelasan mengenai penelitian yang akan dilakukan, termasuk tujuan penelitian, pemeriksaan yang akan dilakukan, risiko dan manfaat dalam mengikuti penelitian (Lampiran 5.), dan diberikan waktu yang cukup untuk memutuskan keikutsertaannya dalam penelitian. Apabila bersedia ikut serta dalam penelitian, subjek diminta untuk mengisi dan menandatangani lembar *informed consent* (Lampiran 6.).

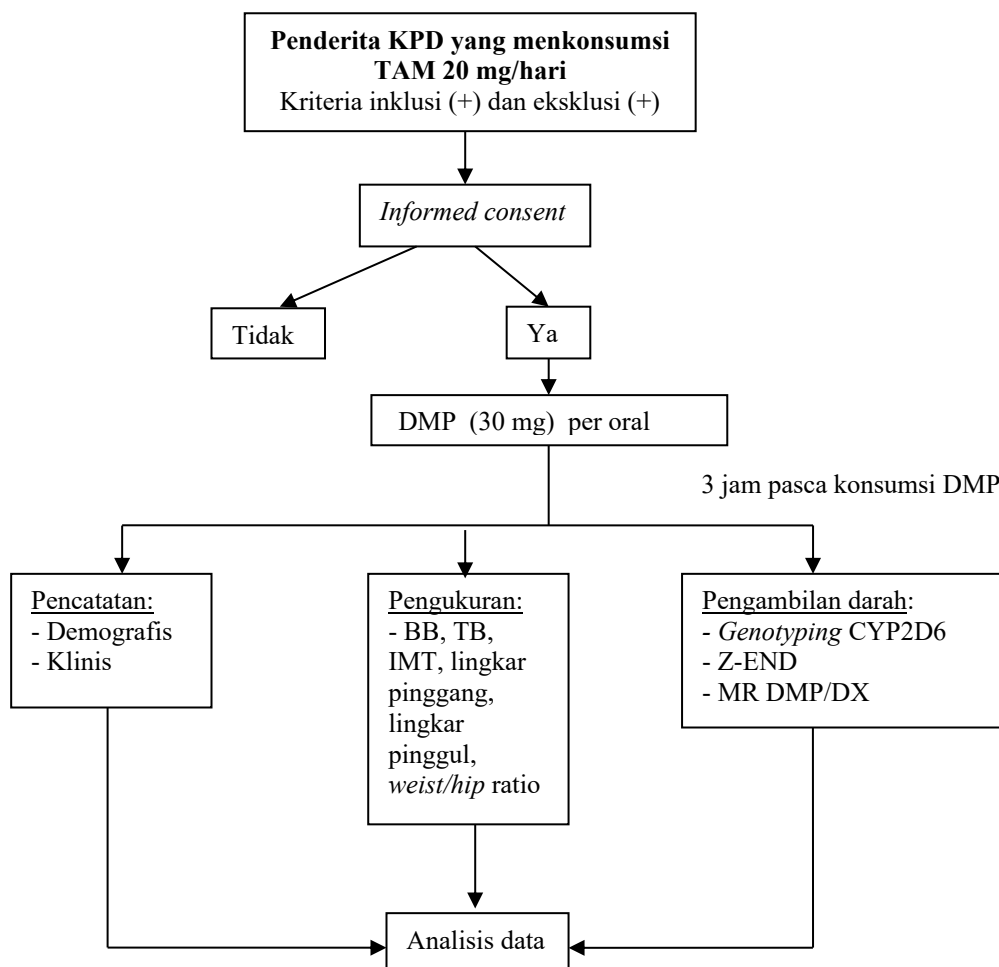
Subjek studi diminta minum obat TAM 20 mg/hari pada waktu biasanya minum obat dan datang ke lokasi penelitian pada waktu yang telah ditentukan dalam kondisi puasa untuk diberikan $\frac{1}{2}$ sendok makan atau 10 mL sirup obat batuk (DMP 30 mg) per oral yang diminum dengan segelas air putih (± 200 mL). Sebelum minum DMP akan dilakukan wawancara untuk mencocokkan identitas, kemudian dilakukan pengukuran antropometrik (berat badan, tinggi badan, IMT, lingkar pinggang, lingkar pinggul, rasio *weist/hip*) terhadap subjek studi. Setelah pengukuran antropometrik akan dilakukan pencatatan data karakteristik demografik dan klinik lainnya yang diisikan pada kuesioner pengumpulan data (Lampiran 6.).

Pada waktu 2 jam setelah mengonsumsi DMP subjek studiizinkan untuk sarapan dengan makanan ringan yang disiapkan oleh peneliti. Pada 3 jam setelah minum DMP subjek studi akan diambil darahnya. Darah diambil menggunakan tabung *vacuetainer* yang mengandung antikoagulan EDTA. Total jumlah darah vena yang diambil dari tiap subjek studi sebanyak ± 15 mL dengan perincian sebagai berikut: untuk pemeriksaan *genotyping* CYP2D6 (3 mL), dan untuk pengukuran kadar Z-END dan MR DMP/DX (9 mL), untuk fungsi hati (3 mL).

Untuk kadar Z-END dan MR DMP/DX, darah yang terkumpul segera dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pisahkan plasma ke dalam *microtube* yang telah dilabel kemudian disimpan pada suhu -80°C sampai saat dilakukan analisis. Untuk pemeriksaan *genotyping* CYP2D6 darah yang terkumpul segera dilakukan isolasi DNA dengan menggunakan kit. DNA hasil isolasi disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan pemeriksaan *genotyping*. Pemeriksaan fungsi hati segera setelah disentrifugasi segera diperiksa pada hari yang sama dengan saat pengambilan darah.

Alur perekrutan subjek studi dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.

Obat-obat lain yang diminum bersama TAM (komedikasi) dan *adverse event* yang dialami/dilaporkan subjek studi juga ikut dicatat.



Gambar 3.1. Alur Perekrutan Subjek

BB= berat badan, TB= tinggi badan, IMT= indeks massa tubuh
Z-END (*zusammen-* endoksifen), DMP= deksstrometorfan, DX=dekstrosfan

3.10 Analisis Data

Analisis deskriptif dilakukan pada variabel penderita KPD yang mencapai MTC-Z-END, genotip CYP2D6*10 (c.100C>T), fenotip CYP2D6 karakteristik demografik, dan klinik. Data dipersentasikan dalam bentuk n (%) untuk data kategorikal dan rerata $\pm$ SB, median (minimal–maksimal), atau median (25–75%) untuk data kontiniu, baik dalam bentuk tabel maupun histogram.

Normalitas distribusi kadar Z-END dan rasio DMP/DEX diperiksa dengan menggunakan uji *Kolmogorof Smirnov* menunjukkan distribusi data tidak normal pada variabel Z-END dan rasio DMP/DEX ($p < 0,001$). Dilakukan normalitas data dengan transformasi nilai ke log. Distribusi kadar Z-END dapat berubah menjadi normal ($p < 0,200$), namun distribusi data tetap tidak normal untuk rasio

DMP/DEX dan DEX ($p < 0,001$) sehingga digunakan uji non-parametrik pada analisis studi ini.

Untuk menentukan fenotip seseorang dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk melihat adanya perbedaan antara MR DMP/DX pada ke-3 kelompok genotip (*gold standard*). Bila ditemukan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan analisis *post-hoc* dengan uji Mann-Whitney untuk melihat kelompok mana yang memberikan perbedaan. Titik potong fenotip PM dan nonPM adalah sebesar 1.01 ditentukan menggunakan *receiver operator curve* (ROC).

Uji Kruskal-Wallis digunakan untuk melihat adanya perbedaan median kadar Z-END pada ke-3 kelompok genotip ($p < 0,001$), maka dilanjutkan dengan analisis *post-hoc* dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat kelompok mana yang memberikan perbedaan.

Analisis bivariat menggunakan uji Chi-square atau Fisher digunakan untuk tujuan menentukan hubungan genotip CYP2D6 (C/C, C/T, dan T/T), fenotip CYP2D6 (PM dan nonPM), karakteristik demografik, karakteristik klinik dalam dengan pencapaian MTC Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia. Hasil dipresentasikan dalam *odds ratio* (OR), interval kepercayaan 95% (IK95%), dan *p value*.

Untuk menentukan variabel yang paling berperan terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma maka variabel-variabel yang memenuhi syarat persyaratan multivariat ($p < 0,25$), dilanjutkan dengan analisis regresi logistik. Hasil dipresentasikan dalam OR, IK 95%, dan *p value*. Batas kemaknaan statistik yang digunakan adalah $p < 0,05$.

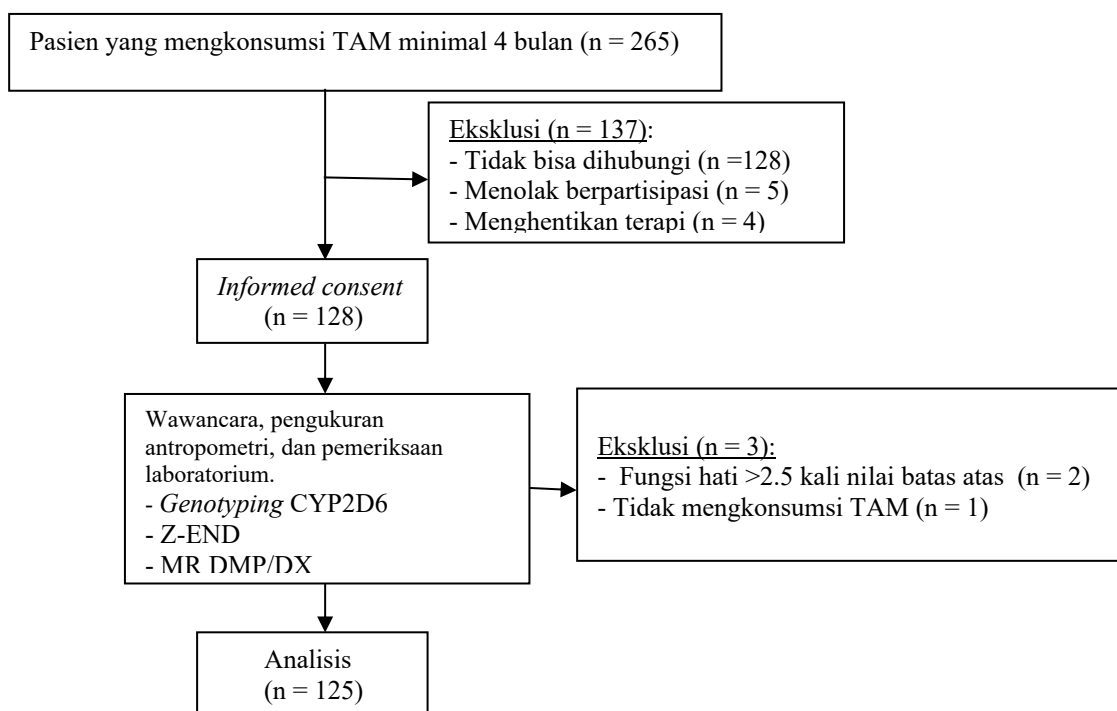
3.11 Etika Penelitian

Studi ini dilaksanakan sesuai dengan persyaratan dari Deklarasi Helsinki dan telah mendapatkan persetujuan Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Nomor: 613/UN2.F1/ETIK/2017) dan Komite Etik Rumah Sakit Kanker Dharmas (Nomor: 054/KEPK/VIII/2017). Penelitian ini sudah diregistrasi ke *clinicaltrials.gov* dengan nomor NCT.03504631.

BAB 4 HASIL

4.1 Alur Pelaksanaan Studi

Pada studi ini dilakukan studi pendahuluan pada 20 orang subjek untuk estimasi besar sampel yang dibutuhkan untuk mencapai tujuan penelitian. Jumlah sampel yang dibutuhkan untuk tujuan mengetahui persentase penderita KPD yang mencapai MTC Z-END dengan dosis TAM 20 mg/hari pada saat *steady state* adalah sebesar 98 orang, namun pada saat pelaksanaan studi dilakukan penambahan jumlah subjek sebanyak 30 orang untuk mengantisipasi adanya data yang tidak lengkap yang mengharuskan pengeliminasian data.



Gambar 4. 1. Diagram Partisipasi Subjek Studi

Z-END = *zusammen-* endoksifen, MR DMP/DX= rasio metabolik dekstrometorfan/dekstrorfan

Studi potong lintang dengan pemilihan subjek secara konsekutif dilakukan sejak bulan Oktober 2017–Februari 2018 di RS.Kanker Dharmais. Tercatat sebanyak 265 penderita KPD yang mengonsumsi TAM minimal selama 4 bulan berdasarkan data penggunaan obat TAM dari instalasi Farmasi rumah sakit tersebut. Dari 265 orang sebanyak 128 tidak dapat dihubungi nomor telponnya, 5 orang menolak

berpartisipasi, dan 4 orang menghentikan terapi TAM (ditukar terapi lainnya). *Informed consent* diberikan pada 128 subjek yang dapat dihubungi dan bersedia ikut berpartisipasi. Bagi subjek yang memberikan *informed consentnya* dilakukan wawancara, pengukuran antropometri, dan pengambilan darah untuk pemeriksaan laboratorium genotip CYP2D6, pengukuran kadar Z-END, dan MR DMP/DX. Pada akhir studi sebanyak 125 subjek dianalisis hingga akhir studi setelah dilakukan eksklusi pada 3 subjek karena fungsi hati tinggi ($n = 2$), dan tidak minum obat ($n = 1$). Diagram partisipasi subjek studi dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.

4.1 Karakteristik Dasar Subjek Studi

Data karakteristik dasar subjek studi yang meliputi karakteristik demografik (usia, IMT, *waist/hip ratio*), karakteristik klinik (usia saat diagnosis, status menopause, waktu minum obat TAM, ukuran tumor, jumlah nodul, metastasis, stadium KPD, ER, PgR, HER2, Ki-67, sub tipe molekular, tipe histologi, indikasi terapi, jenis terapi, interaksi obat potensial, kadar SGPT, rasio kadar SGPT/SGOT, *non-alcoholic fatty liver*, riwayat kemoterapi, dan *adherence*) dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1. Distribusi Karakteristik Dasar Subjek Studi ($n = 125$)

Karakteristik Dasar	Rerata $\pm$ SB	n (%)
Karakteristik demografik		
- Usia (tahun)	44,5 $\pm$ 7,4	
Non-lansia		119 (95,2)
Lansia		6 (4,8)
- IMT (kg/m^2)	24,5 $\pm$ 3,9	
Berat badan kurang		5 (4,0)
Berat badan normal		41 (32,8)
Berat badan lebih		29 (23,2)
Obesitas		50 (40,0)
- <i>Waist/hip ratio</i> [median (min–mak)]	0,86 (0,7–1,1)	
Normal		29 (23,2)
Tinggi		96 (76,8)
Karakteristik klinik		
- Usia saat diagnosis (tahun)	42,25 $\pm$ 7,0	
Dewasa muda		13 (10,4)
Dewasa tua		112 (89,6)
- Status menopause		
Pramenopause		98 (78,4)
Pascamenopause		27 (21,6)

Tabel 4.1. Sambungan

Karakteristik Klinik	Rerata $\pm$ SB	n (%)
- Waktu minum obat TAM		
Bukan malam		44 (35,2)
Malam		81 (64,8)
- Ukuran tumor (cm)		
0 – 2		36 (28,8)
>2 – 5		69 (55,2)
> 5		20 (16,0)
- Jumlah nodul (buah)		
0		50 (40,0)
1 – 3		36 (28,8)
4 – 9		29 (23,2)
10 -20		10 (8,0)
- Metastasis		
Ya		15 (12,0)
Tidak		110 (88,0)
- Stadium KPD		
Stadium dini		72 (57,6)
Stadium lanjut lokal		44 (35,2)
Stadium lanjut		9 (7,2)
- Reseptor Estrogen		
Positif		114 (91,2,)
Negatif		11(8,8)
- PgR		
Positif		104 (83,2)
Negatif		21 (16,8)
- HER-2		
Positif		23 (18,4)
Negatif		96 (76,8)
Meragukan		6 (4,8)
- Ki-67		
Tinggi		68 (54,4)
Rendah		57 (45,6)
- Subtipe molekular		
Luminal A		49 (39,2)
Luminal B-like (HER2-)		43 (34,4)
Luminal B-like (HER2+)		17 (13,6)
Lainnya		12 (12,8)
Tipe histologi		
<i>Invasive carcinoma of no special type</i>		104 (83,2)
<i>Invasive lobular carcinoma</i>		10 (8,0)
Lainnya		11 (8,8)
Indikasi terapi		
Adjuvan		110 (88,0)
Primer		15 (12,0)
Jenis terapi		
Tamoksifen		106 (84,8)
Tamoksifen + goserelin asetat		18 (14,4)
Tamoksifen + radioterapi		1 (0,8)
Interaksi Obat Potensial		
Ya		18 (14,4)
Tidak		107 (85,6)
Kadar SGPT (U/L) [median (min–mak)]	17,0 (6,0–56)	
Normal		99 (79,2)
Tinggi		26 (20,8)

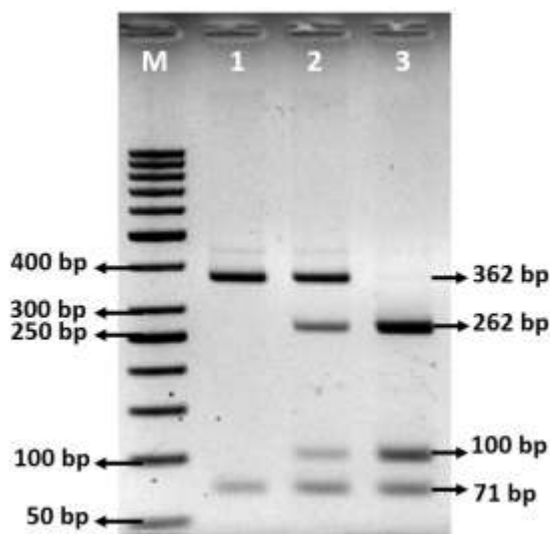
Tabel 4.1. Sambungan

Karakteristik Klinik	Rerata $\pm$ SB	n (%)
Rasio Kadar SGPT/SGOT (U/L)	0,88 $\pm$ 0,262	
Normal		94 (75,2)
Tinggi		31 (24,8)
<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>		
Tidak		110 (88,0)
Ya		15 (12,0)
Riwayat kemoterapi sebelumnya		
Tidak		50 (40)
Ya		75 (60)
<i>Adherence</i>		
Rendah		32 (25,6)
Sedang		54 (43,2)
Tinggi		39 (31,2)

Keterangan:

Definisi variabel dari karakteristik demografik dan klinik dari Tabel 4.1 dapat dilihat pada bagian definisi operasional studi ini.

4.3 Genotyping Gen CYP2D6*10 (c.100C>T)



Gambar 4. 2. Hasil PCR RFLP Gen CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan Enzim HphI

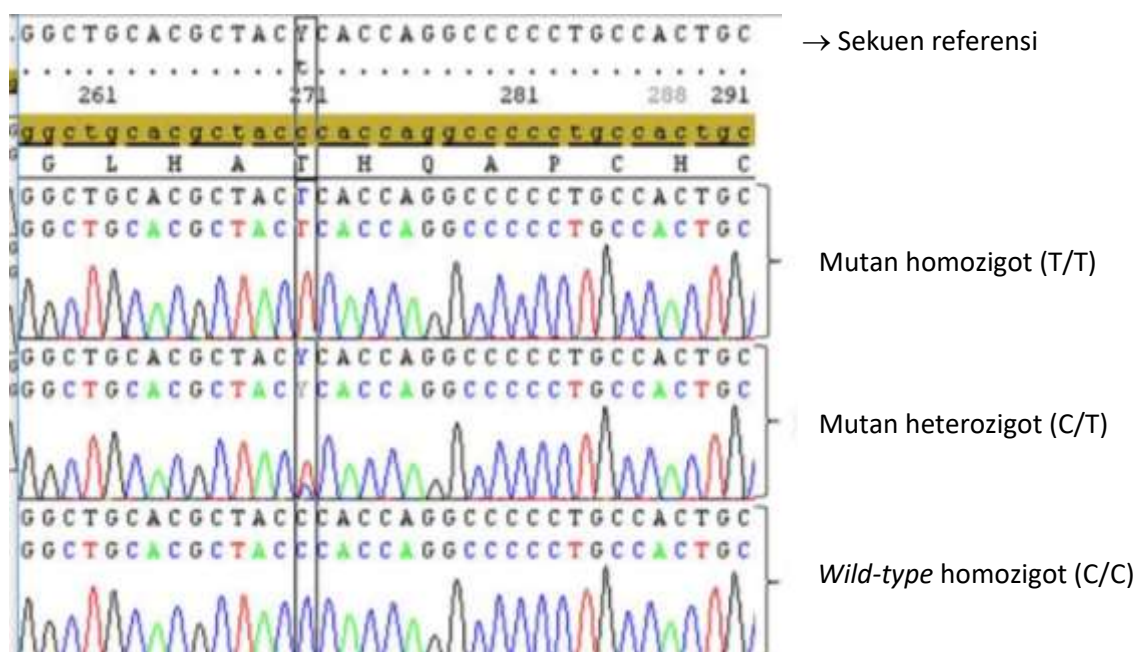
Hasil elektroforesis gel agarose 2,5% (100 V, 35 menit) dengan pewarna etidium bromide 8%. Sampel pada jalur 1 adalah homozigot *wild type* C/C (362 bp dan 71 bp), sampel pada jalur 2 adalah heterozigot mutan C/T (362 bp, 262 bp, 100 bp, 71 bp), dan sampel pada jalur 3 adalah homozigot mutan T/T (262 bp, 100 bp, 71 bp). M adalah marker 50 bp.

Produk PCR (amplikon) yang dihasilkan berukuran 433 bp. Genotip ditentukan berdasarkan ukuran bp fragmen DNA yang terbentuk setelah didigesti oleh enzim HphI. *Pattern* yang terbentuk setelah elektroforesis pada gel adalah sebagai berikut homozigot *wild-type* (C/C= 362 bp + 71 bp), heterozigot mutan (C/T= 362 bp, 262

bp, 100 bp, 71 bp), dan homozigot mutan (T/T= 262 bp, 100 bp, 71 bp) (**Gambar 4.2**).

Dari total 125 subjek, sebanyak 120 subjek berhasil dilakukan *genotyping* dengan menggunakan metode Bagheri *et al.*,¹³⁸ namun ada 5 subjek yang tidak ditemukan produk PCRnya dengan menggunakan *primer* berdasarkan metode di atas.

Untuk mengonfirmasi hasil PCR-RFLP secara random dipilih 3 subjek yang mewakili genotip C/C, C/T, dan T/T. Adapun sampel yang dilakukan sekuensing adalah subjek nomor (SN) 9 (genotip mutan homozigot), SN.3 (genotip mutan heterozigot), dan SN.41 (genotip *wild-type* homozigot) yang sebelumnya telah dianalisis dengan metode PCR-RFLP (**Gambar 4.3**).



Gambar 4.3. Hasil Sekuensing Tiga Sampel dengan Genotipe CYP2D6*10 yang Berbeda

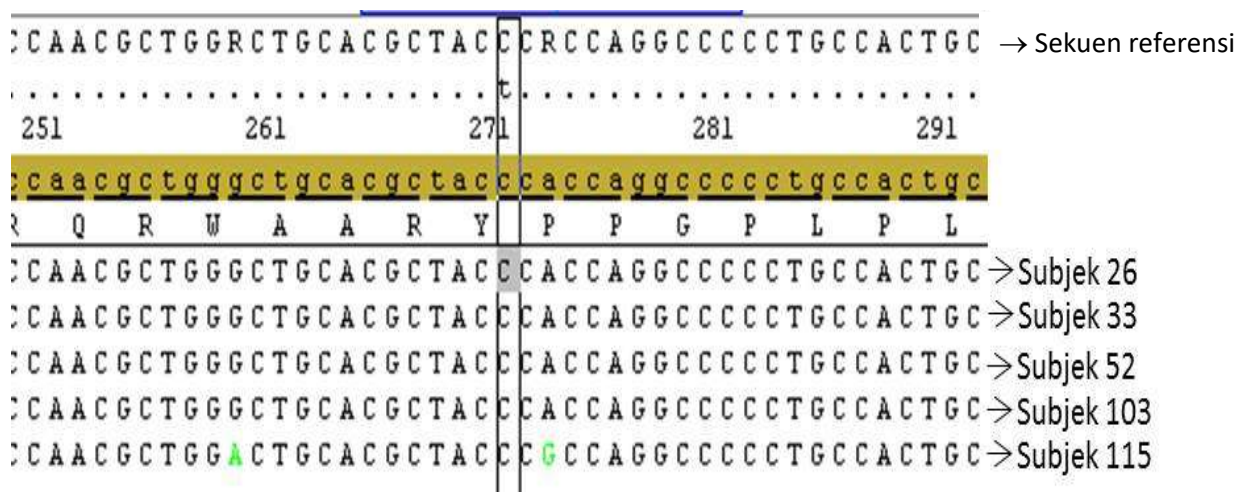
Hasil *sekuensing* produk PCR berukuran 433 bp (Bagheri *et al.*¹³⁸). Titik mutasi terletak pada posisi basa ke-270. Mutan homozigot (T/T) memiliki basa T, mutan heterozigot (C/T) memiliki basa C atau T (Y), dan *wild-type* homozigot (C/C) memiliki basa C.

Titik mutasi terletak pada posisi basa ke-270 pada *sekuens* produk PCR (433 bp). Pada basa ke-270, hasil sekuensing produk PCR sampel mutan homozigot (T/T)

menunjukkan basa T, sampel mutan heterozigot (C/T) menunjukkan basa C atau T yang ditandai dengan huruf Y, dan sampel *wild-type* homozigot (C/C) akan menunjukkan basa C (Gambar 4.3.). Hasil sekuensing dicocokkan dengan sekuens referensi gen CYP2D6 di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) dengan *accession number* M33388.

Hasil *genotyping* pada 120 subjek menunjukkan frekuensi genotip homozigot mutan (T/T) adalah 23 subjek (19,2%), heterozigot mutan (C/T) adalah 37 subjek (30,8%), dan homozigot mutan adalah 60 subjek (50%).

Pada 5 sampel dengan produk PCR negatif dengan *primer* Bagheri *et al.*¹³⁸ digunakan *primer* Moderasi-Nejad *et al.*¹³⁹ Produk PCR yang dihasilkan berukuran 503 bp kemudian dilanjutkan dengan sekuensing. Hasil sekuensing untuk kelima sampel dapat dilihat pada **Gambar 4.4.**

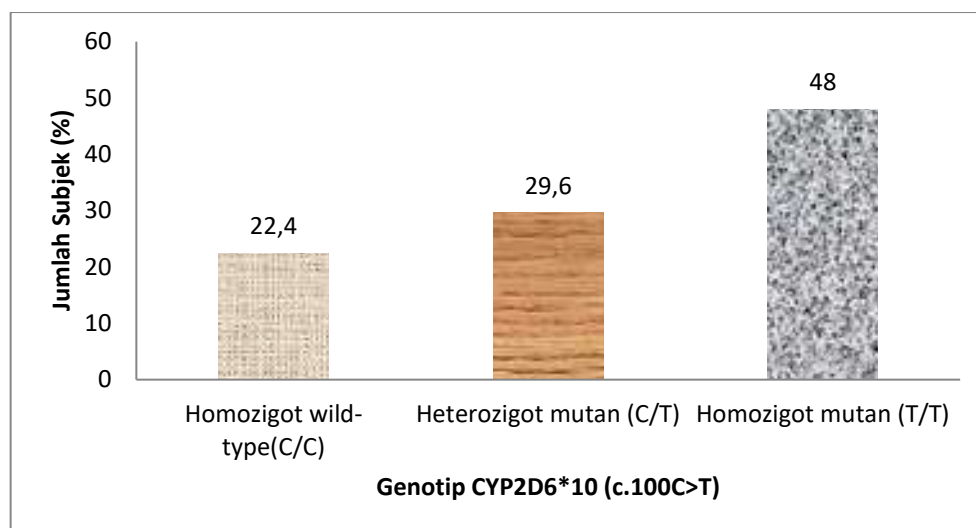


Gambar 4.4. Hasil Sekuensing Lima Sampel PCR Negatif

Hasil sekuensing produk PCR berukuran 503 bp menggunakan *primer* metode Moderasi-nejad *et al.*¹³⁹. Subjek 26, 33, 52 103, dan 119 memiliki basa C pada posisi basa ke-271 dari produk PCR.

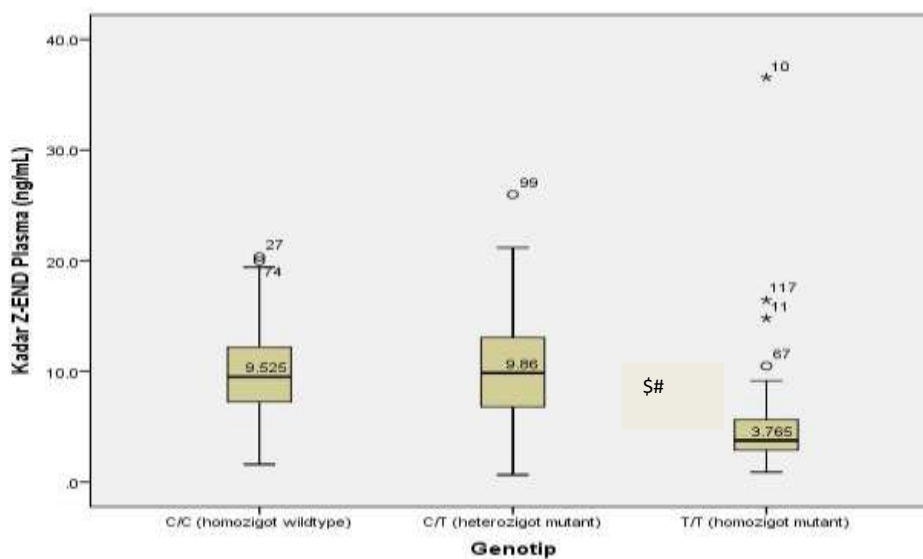
Berdasarkan hasil sekuensing dapat disimpulkan bahwa genotip kelima sampel adalah *wild-type* homozigot yang dapat dilihat dari adanya basa C pada urutan basa ke-271 produk PCR (503 bp).

Pada **Gambar 4.5.** dapat dilihat persentase genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) pada 125 subjek studi. Persentase genotip terbanyak subjek studi adalah homozigot mutan/T/T (48,0%).



Gambar 4.5. Persentase Genotip CYP2D6*10 (c.100C>T)

Median (25–75%) kadar Z-END subjek studi dari masing-masing genotip adalah sebagai berikut: genotip C/C = 9,58 (0,7–6,0) ng/mL, C/T = 9,86 (0,7–26,6) ng/mL, dan T/T = 3,76 (0,9–26,6) ng/mL. Hasil analisis dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan ada perbedaan yang bermakna secara statistik antara ketiga kelompok genotip ($p < 0,001$). Analisis *post-hoc* dengan Mann Whitney menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok genotip T/T dengan kelompok genotip C/C, dan C/T ($p < 0,001$).



Gambar 4.6. Median Kadar Z-END Berdasarkan Genotip CYP2D6*10

^{\$} Uji Mann Whitney C/C vs. T/T ($p < 0,001$); [#] C/T vs. T/T ($p < 0,001$)

4.4 Validasi Metode Bioanalitik

Suatu upaya yang dilakukan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan penggunaannya adalah dengan melakukan validasi metode bioanalitik. Parameter validasi bioanalitik yang dilakukan dalam pengukuran ketiga analit dalam plasma meliputi selektivitas, *carry over*, *lowest limit of quantification* (LLOQ), kurva kalibrasi/linearitas (*calibration curve*), akurasi, presisi, efek matriks (*matrix effect*), stabilitas (*short term, post preparative, post term stability*).

4.4.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan parameter validasi untuk melihat apakah metode yang digunakan dapat mengukur analit. Menurut EMA *guideline* parameter ini dilihat dari persentase area pengotor (*% interference*) antara LLOQ dengan blanko plasma, tidak lebih dari 20% untuk analit dan 5% untuk internal standar. Hasil pengukuran 6 subjek yang berbeda menunjukkan bahwa % area pengotor untuk DMP dalam blanko plasma berkisar 9,21–18,66%. Tidak ada interferensi dari Z-END, DX, dan bisoprolol (IS) dalam blanko plasma. Hasil validasi metode bioanalitik parameter selektivitas memenuhi kriteria EMA untuk ketiga analit.

4.4.2 Carry Over

Carry over merupakan parameter validasi untuk melihat pengaruh pengukuran ULOQ terhadap blanko plasma. Area analit dan internal standar pada blanko tidak lebih dari 20% dan 5% dari LLOQ. Hasil pengukuran menunjukkan tidak *carry over* (0%) dari Z-END, sementara untuk DMP adalah 9,25%, DX 4,49% dari area LLOQ. *Carry over* DMP adalah 0,10% dari area standar internal. Hasil validasi metode bioanalisis parameter *carry over* memenuhi kriteria EMA untuk ketiga analit

4.4.3 Lowest Limit of Quantification

LLOQ merupakan batas terendah yang dapat terukur secara kuantitatif. LLOQ untuk Z-END, DMP (0,50 ng/mL), dan DX dalam plasma adalah sebesar 0,50 ng/mL. Adapun batas LLOQ menurut ketentuan EMA yaitu sinyal analit (luas area analit) dari sampel LLOQ paling sedikit 5 kali dari luas area blanko plasma. Hasil validasi metode bioanalitik parameter *lower limit of quantification* memenuhi kriteria EMA untuk ketiga analit.

4.4.4 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi mencakup rentang kadar yang diharapkan dalam metode bioanalitik ini yang meliputi LLOQ) dan ULOQ. Hasil metode bionalitik menunjukkan deviasi kadar Z-END pada perhitungan ulang dari kadar semula berada dalam rentang 7,63–15,49% (LLOQ) dan -14,44–12,78% (untuk konsentrasi lainnya) dengan koefisien korelasi (r) = 0,99. Deviasi kadar DMP pada perhitungan ulang dari kadar semula berada dalam rentang 1,73–12,53% (LLOQ) dan -9,43– 14,96 % (untuk konsentrasi lainnya) dengan r = 0,99. Deviasi kadar DX pada perhitungan ulang dari kadar semula berada dalam rentang -9,07–(-6,19)% (LLOQ) dan -13,19–14,91 % (untuk konsentrasi lainnya) dengan r = 0,99. ¹¹²

Syarat yang diterima menurut standar EMA adalah pada perhitungan ulang kadar analit pada standar kalibrasi menunjukkan penyimpangan rerata kadar (CV) dari nilai sebenarnya tidak boleh lebih dari $\pm 15\%$, kecuali untuk LLOQ ($\pm 20\%$). Paling sedikit 75% dari standar kalibrasi harus memenuhi kriteria ini termasuk LLOQ dan ULOQ untuk LLOQ. Hasil validasi metode bioanalisis parameter kurva validasi memenuhi kriteria EMA untuk ketiga analit.

4.4.5 Akurasi

Akurasi dilakukan untuk menunjukkan tingkat kedekatan hasil analisis dengan nilai sebenarnya. Akurasi dapat dilakukan dengan *within run* (dalam satu hari) dan *between run* (beda hari) dengan tujuan untuk melihat apakah ada perbedaan hasil jika dilakukan pada hari yang sama atau berbeda hari. Baik *within run accuracy* maupun *between run accuracy* dikerjakan pada 4 kadar (LLOQ, *low* QC, *medium* QC, dan *high* QC) pada 5 *replicate*, untuk *between run accuracy* dikerjakan paling sedikit pada 2 hari yang berbeda.

Hasil *within run accuracy* pada metode bioanalisis ini adalah penyimpangan kadar Z-END sebesar 0,88% untuk LLOQ, dan berkisar antara 0,86–13,94% untuk kadar lainnya. Penyimpangan kadar DMP sebesar -4,26% untuk LLOQ dan berkisar antara -3,19–14,43% untuk kadar lainnya. Penyimpangan kadar DX sebesar 10,95% untuk LLOQ dan berkisar antara -10,52–14,69% untuk kadar lainnya. Hasil *between run accuracy* pada metode bioanalisis ini adalah penyimpangan kadar Z-END sebesar 3,88% untuk LLOQ, dan berkisar antara -1,97–(-7,95)% untuk kadar lainnya. Penyimpangan kadar DMP sebesar -4,68% untuk LLOQ dan berkisar antara -2,01–0,69% untuk kadar lainnya. Penyimpangan kadar DX sebesar -10,48% untuk LLOQ dan berkisar antara 3,99–7,63% untuk kadar lainnya.

Syarat yang diterima menurut standar EMA adalah penyimpangan rerata kadar dari nilai sebenarnya tidak boleh lebih dari 15% untuk sampel QC dan 20% untuk LLOQ untuk kedua jenis akurasi. Hasil validasi metode bioanalitik parameter *within run* dan *between run accuracy* memenuhi kriteria EMA untuk ketiga analit.

4.4.6 Presisi

Presisi dilakukan untuk menunjukkan kedekatan hasil pengukuran bila dilakukan pengukuran berulang. Hasil *within run precision* pada metode bioanalitik ini adalah nilai CV untuk END adalah 19,19% untuk LLOQ dan berkisar antar 2,34–12,33% untuk kadar lainnya. Nilai CV untuk DMP adalah 16,12% untuk LLOQ dan berkisar antar 1,8–6,95% untuk kadar lainnya. Nilai CV untuk DX adalah 15,61% untuk LLOQ dan berkisar antar 6,59–10,96% untuk kadar lainnya. Hasil *between run precision* pada metode bioanalisis ini adalah nilai CV untuk Z-END adalah

9,11% untuk LLOQ dan berkisar antar 3,87–8,15% untuk kadar lainnya. Nilai CV untuk DMP adalah 13,24% untuk LLOQ dan berkisar antar 8,14–9,98% untuk kadar lainnya. Nilai CV untuk DX adalah 5,60% untuk LLOQ dan berkisar antar 5,34–6,16% untuk kadar lainnya.

Syarat yang diterima menurut standar EMA adalah CV dari masing-masing analit tidak boleh lebih dari 15% untuk sampel QC dan 20% untuk LLOQ. Hasil validasi metode bioanalitik untuk parameter *within run* dan *between run accuracy* memenuhi kriteria EMA.

4.4.7 Efek Matriks

Parameter ini dilakukan untuk melihat apakah ada pengaruh matriks (plasma) dalam pengujian analit pada kadar tinggi dan rendah dalam plasma. Hasil validasi metode bioanalitik ini menunjukkan persentase CV IS-normalized MF untuk Z-END adalah 14,97% untuk *low* QC dan 13,92% untuk *high* QC. Persentase CV IS-normalized MF untuk DMP adalah 13,08% untuk *low* QC dan 10,52% untuk *high* QC. Persentase CV IS-normalized MF untuk DX adalah 14,62% untuk *low* QC dan 11,94% untuk *high* QC.

Syarat yang diterima menurut standar EMA adalah persentase koefisien variasi IS-normalized MF yang dihitung dari 6 sumber matriks yang berbeda di bawah 15%. Hasil validasi metode bioanalisis parameter efek matriks memenuhi kriteria EMA.

4.4.8 Stabilitas

Short term stability diperoleh hasil deviasi rerata kadar Z-END sebelum disimpan pada suhu beku berkisar -13,25–(-8,10)% dan -2,03–3,52% untuk *low* dan *high* QC. Deviasi rerata kadar DMP sebelum disimpan pada suhu beku untuk *low* QC (-11,26–0,98%) dan *high* QC (-2,03–3,52%). Deviasi rerata kadar dekstorfan sebelum disimpan pada suhu beku untuk *low* QC (-1,63–7,40%) dan *high* QC (-11,93–9,28%). Hasil *short term stability* menunjukkan sampel plasma stabil pada suhu ruang selama 24 jam.

Post preparative stability diperoleh hasil deviasi rerata kadar Z-END sebelum disimpan pada suhu beku berkisar 5,62–8,51% dan 11,91–14,25% untuk *low* dan

high QC. Deviasi rerata kadar DMP sebelum disimpan pada suhu beku untuk *low QC* (-8,43–(-1,58)%) dan *high QC* (-7,41–7,55%). Deviasi rerata kadar dekstorfan sebelum disimpan pada suhu beku untuk *low QC* (3,09–12,56%) dan *high QC* (-0,41–4,42%). Hasil *post preparative stability* menunjukkan sampel plasma stabil pada autosampler selama penyimpanan 12 jam.

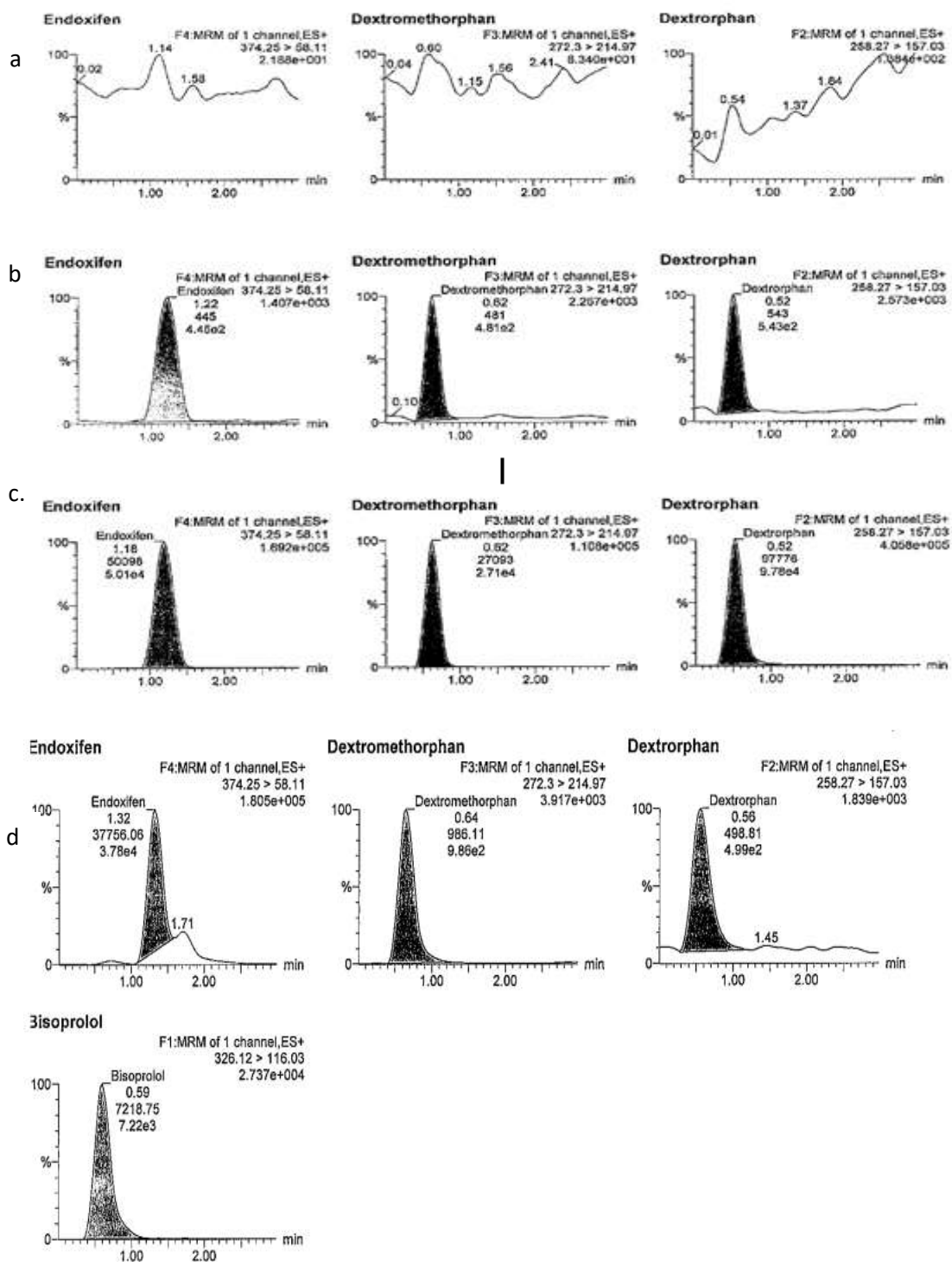
Long term stability diperoleh hasil deviasi rerata kadar Z-END sebelum disimpan pada suhu beku berkisar -14,99–6,52% dan -4,47–7,13% untuk *low* dan *high QC*. Deviasi rerata kadar DMP sebelum disimpan pada suhu beku berkisar -10,35–3,50% dan -1,25–11,10% untuk *low* dan *high QC*. Deviasi rerata kadar dekstorfan sebelum disimpan pada suhu beku berkisar 8,06–13,60% dan -2,01–12,01% untuk *low* dan *high QC*. Hasil *long term stability* menunjukkan sampel plasma stabil pada suhu di bawah -20 °C selama 44 hari.

Syarat yang diterima menurut standar EMA adalah deviasi kadar yang terukur pada uji stabilitas tidak lebih dari 15% dari konsentrasi awal pada *short term*, *post preparative*, dan *long term stability*. Hasil validasi metode bioanalisis parameter *stability* memenuhi kriteria EMA.

4.4.9 Dilution Integrity

Parameter *dilution integrity* dilakukan untuk melihat nilai keakuratan dan presisi dari kadar setelah pengenceran. Pada saat pengukuran kadar Z-END, DMP, dan DX tidak diperlukan pengenceran. Validasi parameter *dilution integrity* tidak dikerjakan karena sampel tidak memerlukan pengenceran.

Validasi metode bioanalitik dilakukan terhadap metode UPLC-MS/MS sebelum dilakukan pengukuran kadar Z-END, DMP, dan DX dalam plasma subjek studi dengan menggunakan blanko plasma (**Gambar 4.7.a**) yang ditambahkan (*spike*) dengan END, DMP, dan DX dengan konsentrasi terendah/*lowest limit of quantification* (LLOQ) (**Gambar 4.7.b**), konsentrasi tertinggi/*upper limit of quantification* (UPLQ) (**Gambar 4.7.c**), dan pada sampel (**Gambar 4.7.d**).



Gambar 4.7. Kromatogram Endoksifen, Dekstrometorfan, dan Dekstrorfan

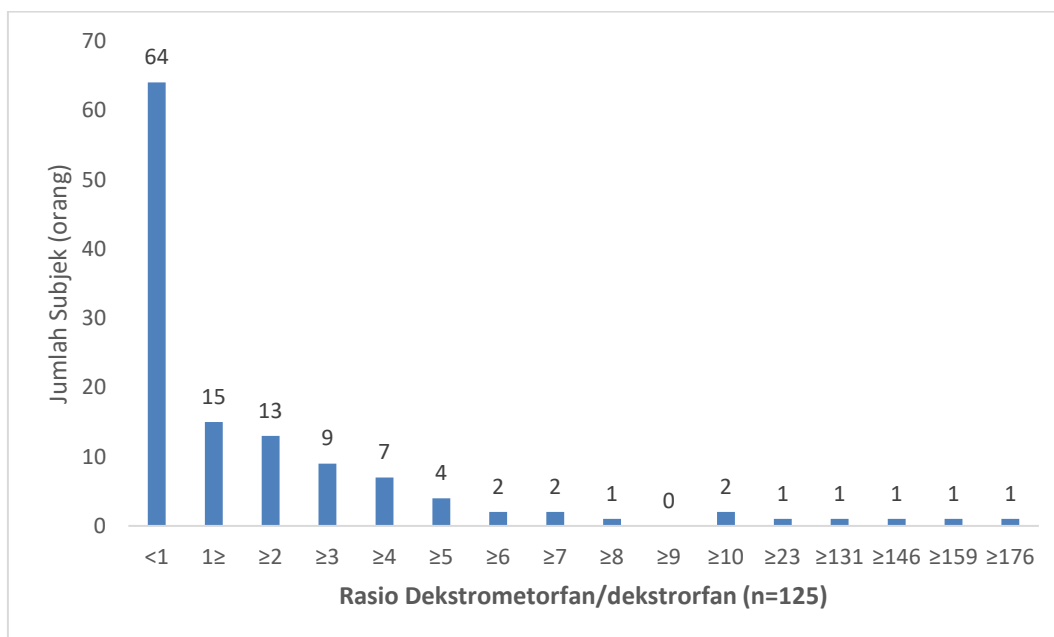
a. Blanko Plasma, b. Standar (*spike* sampel konsentrasi rendah), c. Standar (*spike* sampel konsentrasi tinggi), dan d. Sampel (subjek studi)

4.5 CYP2D6 Phenotyping

Fenotip subjek studi ditentukan berdasarkan MR DMP/DX. Tiga jam pasca konsumsi DMP 30 mg per oral median (25–75%) kadar DMP subjek studi adalah 5,83 (2,93–18,77) ng/mL dan rerata $\pm$ SB DX adalah $6,43 \pm 2.97$ ng/mL. Kadar DMP dan DX dalam plasma pada subjek studi sangat bervariasi antar subjek studi dengan rentang kadar 0,68–52,52 ng/mL (DMP) dan 0,25–15,6 ng/mL (DX). Kadar DMP dapat terukur pada semua subjek dengan metode pengukuran yang digunakan. Pada 4 subjek kadar DX tidak dapat dideteksi karena di bawah LLOQ dari alat pengukuran yaitu (0,5 ng/mL). Pada ke-4 subjek tersebut maka nilai DX ke-4 subjek ini dianggap sebesar 0,25 ng/mL (1/2 LLOQ) dari alat UPLC-MS/MS. Nilai MR DMP/DX pada 4 subjek ini adalah 131,2 (SN.57), 146,0 (SN.109), 159,2 (SN.26), dan 176,0 (SN.103).

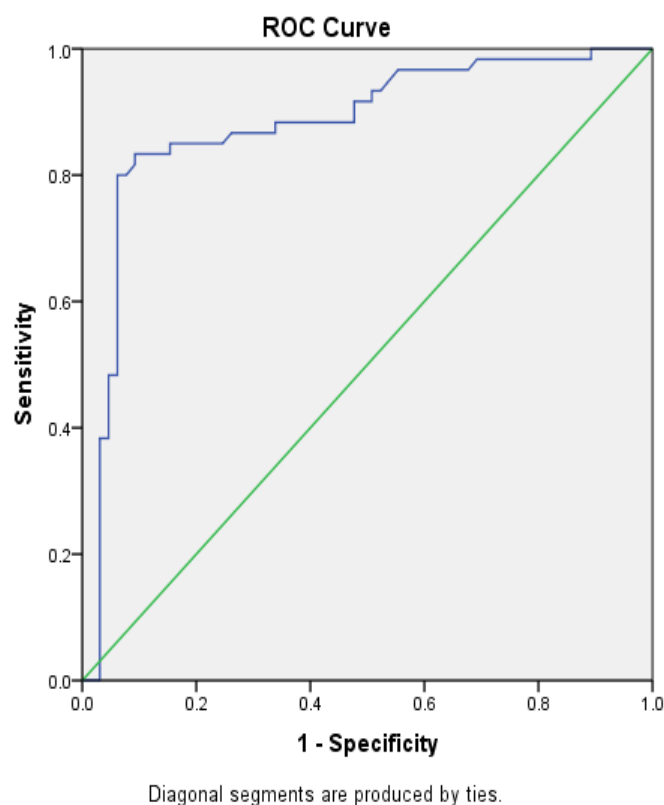
Nilai median (25–75%) MR DMP/DX adalah 0,91 (0,43–3,15). Terlihat adanya perbedaan yang sangat mencolok antara MR DMP/DX terendah (0,13) dan tertinggi (176,0). Histogram MR DMP/DX dapat dilihat pada **Gambar 4.8**.

4.5.1 Rasio Metabolik Dekstrometorfan/ Dekstrorfan (MR DMP/DX)



Gambar 4.8. Histogram Rasio Metabolik Dekstrometorfan/Dekstrorfan

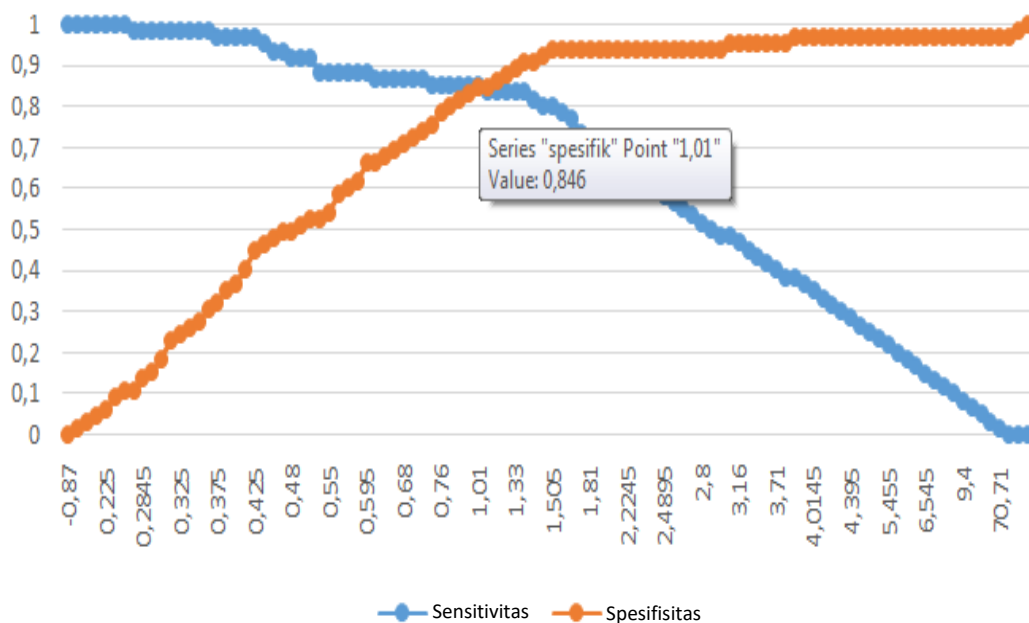
Pada **Gambar 4.8.** dapat dilihat histogram MR DMP/DX memperlihatkan paling tidak ada distribusi bimodal. Untuk mengkonfirmasi hasil dari **Gambar 4.8.** dilakukan uji statistik untuk melihat apakah MR DMP/DX (*phenotyping*) dapat menggantikan *genotyping* dalam memprediksi kadar Z-END adalah dengan melihat apakah ada perbedaan bermakna antara MR DMP/DX dibandingkan *gold standard* (*genotip*). Karena distribusi data tidak normal dan ada lebih dari dua kelompok yang akan diuji maka digunakan uji non-parametrik dalam hal ini uji Kruskal-Wallis. Dengan uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $p < 0.001$, maka paling tidak terdapat perbedaan antara dua kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan harus dilakukan analisis *post-hoc* dengan uji Mann-Whitney. Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan tidak ada perbedaan antara EM dengan IM, namun ada perbedaan antara EM dan IM (nonPM) dengan PM ($p < 0,001$) (Tabel uji Kruskal Wallis dan Mann-Whitney dapat dilihat pada Lampiran 16.). Hasil uji statistik ini mengkonfirmasi bahwa terdapat 2 jenis fenotip, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ROC.



Gambar 4.9. Kurva ROC Ratio Metabolik Dekstrometorfam/Dekstrofan

Penentuan titik potong (*cut-off*) PM dan non-PM dilakukan menggunakan *receiver operator curve* (ROC). Pada **Gambar 4.9.** dapat dilihat kurva ROC menunjukkan MR DMP/DX mempunyai nilai determinasi yang baik karena kurva jauh dari garis 50% dan mendekati 100%. Nilai diskriminasi antara nonPM dan PM diketahui dengan melihat nilai *area under the curve* (AUC) yaitu sebesar 88,0% (IK95% = 0,815–0,946%); $p < 0,001$) yang berarti secara statistik nilai diskriminasi uji ROC cukup kuat untuk dapat menentukan titik potong subjek yang masuk kriteria nonPM maupun PM. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan bahwa fenotip dapat digunakan untuk memprediksi kadar Z-END dalam plasma (Tabel penentuan nilai AUC dapat dilihat di Lampiran 8).

Berdasarkan nilai *coordinates of the curve* dari ROC ditentukan titik potong dari nonPM maupun PM yaitu sebesar 1,01 berdasarkan nilai sensitivitas (85,0%) dan spesivisitas (84,6%) yang sama besar. Pada **Gambar 4.10.** dapat dilihat nilai sensitivitas dan spesivisitas yang digunakan untuk menentukan titik potong dari fenotip subjek studi.

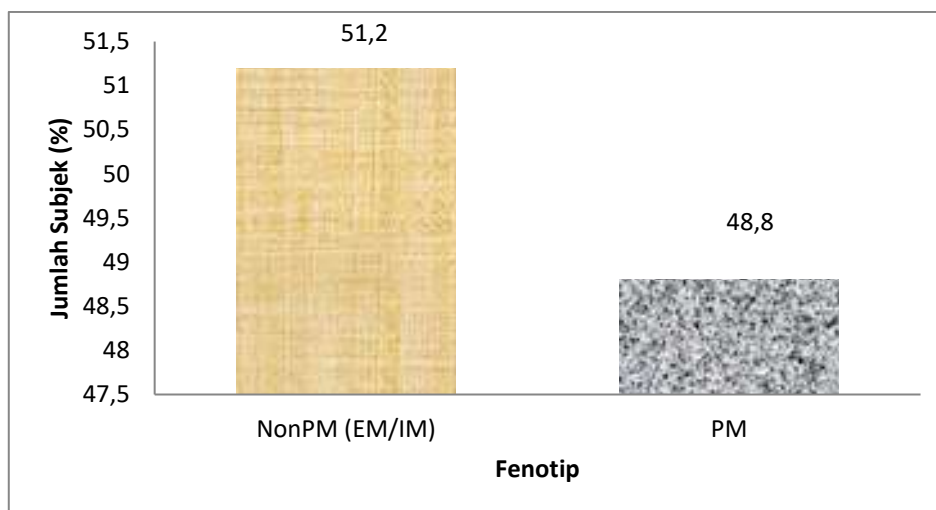


Gambar 4.10. Penentuan Titik Potong Fenotip CYP2D6

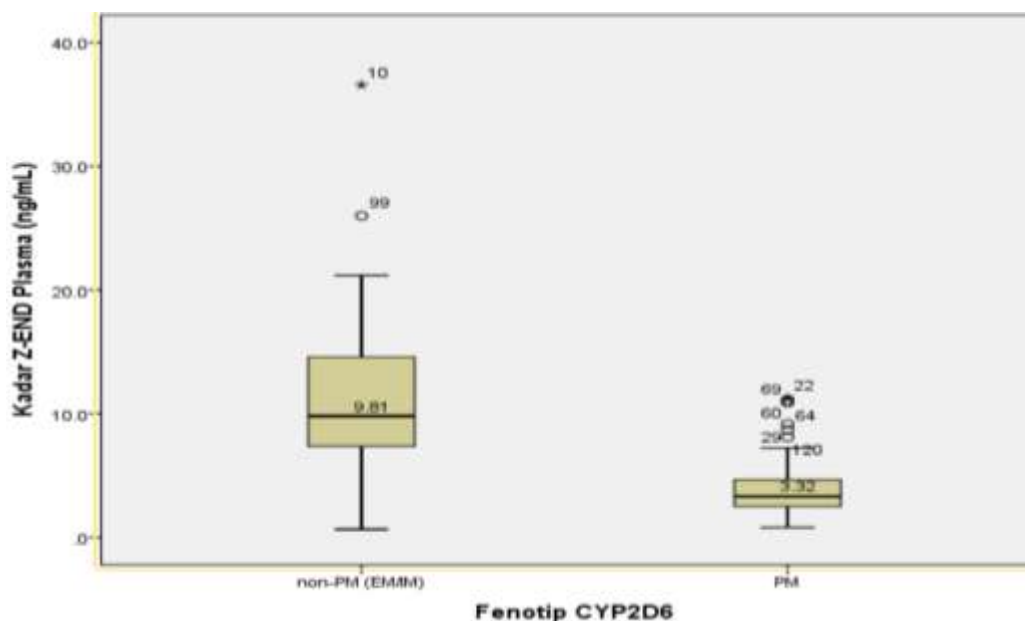
Berdasarkan sensitivitas dan spesifisitas sama besar ($\pm 85\%$) diperoleh titik potong fenotip CYP2D6 subjek studi sebesar 1,01

4.5.2 Frekuensi *Poor Metabolizer* dan *Non-Poor Metabolizer* dari Gen CYP2D6

Menggunakan titik potong 1,01 sebagai pembeda fenotip PM dan non-PM maka diperoleh persentase fenotip PM ditemukan sebesar 48,8% pada subjek studi (Gambar 4.11.).



Gambar 4.11. Persentase *Poor Metabolizer* (PM) dan *non-Poor Metabolizer* (NonPM) dari Gen CYP2D6

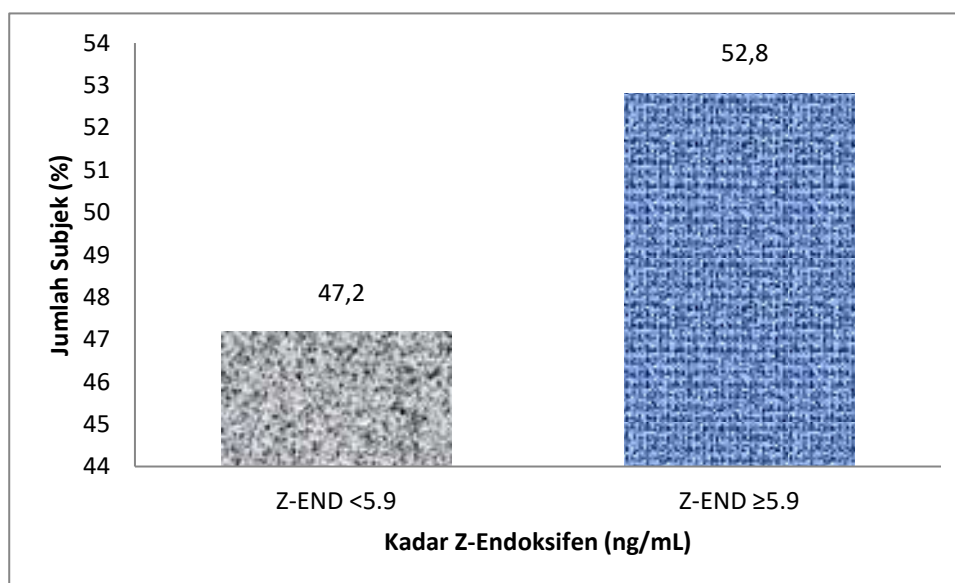


Gambar 4.12, Median Kadar Z-END Berdasarkan Fenotip CYP2D6

Median (25–75%) kadar Z-END berdasarkan kelompok fenotip, fenotip non-PM sebesar 9,81 (7,36–14,59) dan PM sebesar 3,32 (2,51–4,66) ng/mL. Analisis dengan Mann Whitney menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kedua kelompok fenotip ($p < 0,001$)

Pada penggunaan *probe drug* DMP 30 mg per oral dosis tunggal secara umum dapat ditoleransi pada 96,8% (120 orang) subjek studi. Terdapat laporan *adverse event* pada 3,2% (5 subjek) berupa pusing (3 subjek) yaitu SN.9 (MR DMP/DX = 1,92), SN.10 (MR DMP/DX = 0,6), SN.87 (MR DMP/DX = 2,70, mual disertai buang air besar cair sebanyak 2 kali (2 subjek) yaitu SN.34 (MR DMP/DX = 2,51), SN.50 (MR DMP/DX = 3,89) pasca konsumsi DMP di mana efek ini sifatnya reversibel dan hilang dalam waktu ± 3 –5 jam.

4.6 Kadar Z-Endoksifen dalam Plasma



Gambar 4.13. Persentase Subjek Studi yang Mencapai MTC Z-Endoksifen

Median (25–75%) kadar Z-END dalam plasma adalah 6,63 (3,18–10,56) ng/mL, dengan rentang kadar Z-END terendah dan tertinggi sebesar 0,7 dan 36,6 ng/mL. (data tidak ditampilkan dalam gambar). Kadar Z-END sangat bervariasi antar subjek (variasi kadar Z-END antar subjek sebesar 52,3 kali lipat antar subjek). Pada penelitian ini hanya 52,8% subjek mencapai MTC Z-END (**Gambar 4.13.**)

4.7 Hubungan Karakteristik Demografik, Klinik, Genotip, dan Fenotip dengan Pencapaian Kadar Z-END Plasma

Untuk melihat hubungan antara karakteristik demografik, klinik, genotip, dan fenotip subjek studi dengan pencapaian kadar Z-END plasma digunakan analisis bivariat dengan menggunakan uji Chi-Square/Fisher (**Tabel 4.2.**).

Tabel 4.2. Hubungan Karakteristik Demografik, Klinik Genotip, dan Fenotip Subjek Studi dengan Pencapaian Kadar Z-END Plasma (n = 125)

Variabel	Z-END (ng/mL)		OR ^a	p value	IK95%
	< 5,9 n (%)	≥ 5,9 n (%)			
Karakteristik demografik					
- Usia (tahun)					
Non-lansia (< 60)	56 (47,1)	63 (52,9)	0,89 ^b	1,00	0,17– 4,58
Lansia (≥ 60)	3 (50,0)	3 (50,0)	1		
- Indeks massa tubuh (kg/m ²)					
Berat badan kurang – normal	21 (45,7)	25 (54,3)	0,906	0,80	0,44– 1,88
Berat badan lebih – obesitas	38 (48,1)	41 (51,9)	1		
- <i>Waist/hip ratio</i> (mean ± SD)					
Normal	10 (34,5)	19 (65,5)	0,505	0,12*	0,21–1,20
Tinggi	49 (51,0)	47 (49,0)	1		
Karakteristik klinik					
- Usia saat diagnosis (tahun)					
Dewasa muda	8 (61,5)	5 (38,5)	1,914	0,27	0,59–6,21
Dewasa tua	51 (45,5)	61 (54,5)	1		
- Status menopause					
Pramenopause	50 (51,0)	48 (49,0)	2,083	0,10*	0,85–5,09
Pascamenopause	9 (33,3)	18 (66,7)	1		
- Waktu minum obat					
Bukan malam	22 (50,0)	22 (50,0)	1,189	0,64	0,57–2,48
Malam	37 (45,7)	44 (54,3)	1		
- Ukuran tumor (cm)					
≤ 2	19 (52,8)	17 (47,2)	1,369	0,43	0,63–2,98
> 2	40 (44,9)	49 (55,1)	1		
- Jumlah nodul (buah)					
0	26 (52,0)	24 (48,0)	1,379	0,38	0,67–2,83
≥ 1	33 (44,0)	42 (56,0)	1		
- Metastasis					
Tidak	54 (49,1)	56 (50,9)	1,929	0,25	0,62–6,01
Ya	5 (33,3)	10 (66,7)	1		
- Stadium KPD					
Stadium dini	35 (48,6)	37 (51,4)	1,143	0,71	0,56–2,33
Stadium lanjut lokal – lanjut	24 (45,3)	29 (54,7)	1		
- Reseptor estrogen					
Positif	53 (46,5)	61 (53,5)	0,724	0,61	0,21–2,51
Negatif	6 (54,5)	5 (45,5)	1		
- PgR					
Positif	49 (47,1)	55 (52,9)	0,980	0,9	0,38–2,51
Negatif	10 (47,6)	11 (52,4)	1		

Tabel 4.2. Sambungan

Variabel	Z-END (ng.mL)		OR ^a	p value	IK95%
	< 5,9 n(%)	≥ 5,9 n(%)			
- HER2					
Positif – meragukan	15 (51,7)	14 (48,3)	1,266	0,58	0,55–2,91
Negatif	44 (45,8)	52 (54,2)	1		
-Ki-67					
Tinggi	35 (51,5)	33 (48,5)	1,458	0,30	0,72–2,96
Rendah	24 (42,1)	33 (57,9)	1		
- Subtipe molekular					
Luminal A	20 (40,8)	29 (59,2)	0,712	0,38	0,33–1,51
Non-luminal A	31 (49,2)	32 (50,8)	1		
Tipe histologi					
<i>Invasive carcinoma of no special type</i>	47(45,2)	57(54,8)	0,618	0,32	0,24–1,59
Lainnya	12(49,1)	9(50,9)	1		
Indikasi terapi					
Adjuvan	54(57,1)	56(42,9)	1,929	0,25	0,62–6,01
Primer	5(33,3)	10(66,7)	1		
Jenis terapi					
Tamoksifen	47(44,3)	56(55,7)	0,465	0,13*	0,17–1,27
Tamoksifen + lainnya	12(63,2)	7(36,8)	1		
Interaksi Obat Potensial					
Tidak	51 (47,7)	56 (52,3)	1,138	0,80	0,42–3,12
Ya	8 (44,4)	10 (55,6)	1		
Kadar SGPT					
Normal	43 (43,4)	56 (56,6)	0,480	0,10*	0,19–1,16
Tinggi	16 (61,5)	10 (38,5)	1		
Rasio Kadar SGPT/SGOT					
Normal	43 (45,7)	51 (54,3)	0,790	0,57	0,35–1,78
Tinggi	16 (51,6)	15 (48,4)	1		
<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i>					
Tidak	49 (44,5)	61 (55,5)	0,402	0,11*	0,13–1,25
Ya	10 (66,7)	5 (33,3)	1		
Riwayat kemoterapi sebelumnya					
Tidak	24 (48,0)	26 (52,0)	1,055	0,88	0,51–2,16
Ya	35 (46,7)	40 (53,3)	1		
<i>Adherence</i>					
<i>Adherence</i> tidak tinggi	48 (55,8)	38 (44,2)	3,215	0,004*	1,42–7,28
<i>Adherence</i> tinggi	11 (28,2)	28 (71,8)			
Genotip					
Non-T/T (C/C, C/T)	13 (20,0)	52 (80,0)	0,076	< 0,001*	0,03–0,18
T/T	46 (76,7)	14 (23,3)	1		
Fenotip					
Non-PM (EM, IM)	9 (14,1)	55 (85,9)	0,036	< 0,001*	0,01–0,09
PM	50 (82,0)	11 (18,0)	1		

Keterangan:

HER-2: *human epidermal growth factor-2*, SGOT: *serum glutamic oxaloacetic transaminase*, SGPT: *serum glutamic pyruvic transaminase*, NAFLD: *nonalcoholic fatty liver disease*, EM: *extensive metabolizer*, IM: *intermediate metabolizer*, PM: *poor metabolizer*, C/C: *homozygote wild-type*, C/T: *heterozygote mutant*, T/T: *homozygote mutant*. Angka dinyatakan dalam jumlah orang (%).

^a = uji Pearson Chi-Square, ^b = uji Fisher, OR = *odds ratio*, p < 0,25 = memenuhi syarat dilakukan uji multivariat

Hasil analisis bivariat menunjukkan terdapat 8 variabel yang memenuhi syarat untuk dilakukannya uji multivariat menggunakan analisis regresi logistik ganda ($p < 0,25$), dan dari 8 variabel tersebut ada 3 variabel yang menunjukkan hubungan bermakna dengan pencapaian kadar Z-END yaitu adherence ($p < 0,004$), genotip ($p < 0,001$), dan fenotip ($p < 0,001$).

4.8 Analisis Multivariat

Untuk melihat variabel yang berperan dalam pencapaian kadar Z-END plasma, analisis regresi logistik ganda dilakukan pada variabel yang dengan uji bivariat mempunyai nilai $p < 0,25$ yaitu *waist/hip ratio*, status menopause, jenis terapi, kadar SGPT, *non-alcoholic fatty liver disease*, *adherence*, genotip, dan fenotip. Hasil analisis regresi logistik ganda dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3. Analisis Regresi Logistik Ganda antara Genotip, dan Fenotip dengan Pencapaian Kadar Z-END Plasma (n = 125)

Variabel	Adjusted OR ^c	p value	IK 95%
Genotip			
Non-T/T (C/C, C/T)	3,01	0,05	0,98–9,22
T/T	1		
Fenotip			
Non-PM (EM/IM)	14,42	< 0,001*	4,68–44,35
PM	1		

Keterangan:

C/C= homozigot *wild-type*, C/T= heterozigot mutan, T/T= homozigot mutan, *poor metabolizer* (PM), *extensive metabolizer* (EM), *intermediate metabolizer* (IM),^c= Analisis regresi logistik ganda, OR= *odds ratio*, P value < 0,05*= bermakna secara statistik

Hasil analisis multivariat menunjukkan fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan secara bermakna dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma. Genotip tidak berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END plasma ($p = 0,05$), namun dimasukkan dalam pemodelan akhir karena secara substansi mempunyai kontribusi yang besar di dalam penentuan fenotip subjek studi. Genotip dan fenotip mempunyai $R \text{ square} = 55,2\%$.

Probabilitas subjek dengan genotip non-T/T untuk mencapai kadar Z-END $\geq 5,9$ ng/mL adalah 45,6%, sementara fenotip non-PM sebesar 71,7%. Probabilitas subjek yang memiliki genotip non-T/T dan fenotip non-PM untuk mencapai kadar Z-END $\geq 5,9$ ng/mL adalah 88,3%

4.9 Penggunaan Obat Lain Bersama Tamoksifen

Dari total 125 subjek yang hanya menggunakan TAM saja ada 60 subjek (48%) dan sebanyak 65 subjek (52%) menggunakan TAM bersama dengan obat lain. Pada **Tabel 4.4.** dapat dilihat obat-obat yang digunakan bersama dengan TAM oleh subjek studi.

Tabel 4.4. Obat-Obat Lain yang Digunakan Bersama Tamoksifen (n = 65)

Nama Obat	Jumlah Subjek (orang)
Goserelin asetat	19
Kalsium-vitamin D3	18
Obat tradisional	9
Amlodipin	8
Warfarin	5
Spirolonakton	3
Bisoprolol	3
Vitamin B	3
Metformin	3
Glikuidon	2
Lansoprazol	2
Valsartan	2
Obat tiroid (propiltiourasil, levotiroksin)	2
Asam ibandronat	2
Sertralin	1
Klorfeniramin	1
Simvastatin	1
Alprazolam	1
Insulin	1
Telbivudin	1
Isosorbid dinitrat	1
<i>Ursodeoxycholic Acid</i>	1
Teofilin	1
Salbutamol	1
Etambutol	1
Isoniazid	1
Rifampisin	1
Ofloksasin	1

Keterangan:

Satu subjek dapat menggunakan satu atau lebih obat secara bersamaan

4.10 Interaksi Obat Potensial

Metabolisme TAM menjadi Z-END melibatkan banyak enzim CYP-P450, pada penggunaan TAM bersama dengan obat-obat lain yang dimetabolisme oleh enzim CYP-P450 memungkinkan terjadinya interaksi dalam proses metabolisme. Pada **Tabel 4.5.** dapat dilihat nama obat-obat yang pada penggunaan bersama TAM dapat memengaruhi enzim yang memetabolisme TAM.

Tabel 4.5. Penggunaan Obat-Obat Lain yang dapat Memengaruhi Enzim yang Memetabolisme Tamoksifen

Sitokrom P-450 (CYP)	Inducers	Inhibitors	Substrat
CYP2D6	Rifampisin (n = 1)	Klorfeniramin (n =1) Sertralin (n =1) Lansoprazol (n =2) Simvastatin (n =1)	Bisoprolol Klorfeniramin Lansoprazol Sertralin
CYP3A4	Rifampisin (n = 1) Simvastatin (n = 1) Spironolakton (n = 3)	Isoniazid (n =1) Amlodipin (n =9)	Alprazolam (n = 1) Amlodipin (n = 9) Simvastatin (n = 1) Klorfeniramin (n = 1) Bisoprolol (n = 3) Teofilin (n = 1) Glikuidon (n = 2)
CYP2C9	Rifampisin (n = 1)	Isoniazid (n = 1)	Warfarin (n = 5) Valsartan (n = 2) Ibuprofen (n = 1)
CYP2C19	Rifampisin (n = 1)	Lansoprazol	Lansoprazole (n = 2) Warfarin (n = 5)
CYP1A2	Insulin (n=1)	Ofloksasin (n =1)	Toefilin (n = 1) Warfarin (n = 5)

4.11 Adverse Event

Selama pelaksanaan semua keluhan yang dirasakan subjek studi dicatat sebagai *adverse event* (AE) pada penggunaan TAM. Dari total 125 subjek studi sebanyak 44 subjek (35,2%) tidak melaporkan adanya AE sementara sebanyak 81 subjek (64,8%) melaporkan adanya ADR selama penggunaan TAM. Pada **Tabel 4.6.** dapat dilihat data ADR yang dilaporkan oleh subjek studi.

Tabel 4.6. Adverse Event Subjek Studi Tamoksifen (n = 125)

<i>Adverse Event</i>	Jumlah subjek	Persentase (%)
Tidak mengalami	44	35,2
<i>Hot flushes</i>	37	29,6
Muskuloskeletal (tulang ngilu kaku dan nyeri otot)	30	24,0
Mudah lelah	16	12,8
Berat badan naik	8	6,4
Depresi	7	5,6
Keputihan	7	5,6
Hiperplasia endometrial	6	4,8
Rambut rontok	6	4,8
Kaki kram	6	4,8
Hiperkoagulasi	5	4
Kesemutan	5	4
Kulit gatal	5	4
Vagina kering	4	3,2
Suka lupa	4	3,2
Instabilitas emosi	4	3,2
Sakit kepala	4	3,2
Mata kabur	3	2,4
Nyeri daerah pelvis	3	2,4
Susah tidur	2	1,6
Vagina gatal	1	0,8
Sariawan	1	0,8
Berat badan turun	1	0,8

Keterangan:

Satu subjek bisa melaporkan beberapa *adverse drug reaction*. Depresi diukur menggunakan kuesioner *Zung's self-rating depression scale*.¹⁴⁴ *Hot flushes* diukur menggunakan *Hot flushes Diary*.¹⁴⁵

Pada **Tabel 4.7.** dapat dilihat hubungan antara *adverse event* (*hot flushes*, sistem muskuloskeletal, depresi, dan hiperplasia endometrial) dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma.

Tabel 4.7. Adverse Event dan Pencapaian MTC Z-END (n = 125)

<i>Adverse Event</i>	Z-END < 5,9 ng/mL n (%)	Z-END ≥ 5,9 ng/mL n (%)	p value^a	95% IK
<i>Hot flushes</i>				
Tidak	41 (41,5)	47 (53,4)	0,83	0,43–1,99
Ya	18 (48,6)	19 (51,4)		
Sistem muskuloskeletal				
Tidak	41 (43,2)	54 (56,8)	0,11	0,22–1,17
Ya	18 (60,0)	12 (40,0)		
Depresi				
Tidak	55 (46,6)	63 (53,4)	0,71 ^b	0,14–3,05
Ya	4 (57,1)	3 (42,9)		
Hiperplasia endometrial				
Tidak	57 (47,9)	62 (52,1)	0,68 ^b	0,32–10,42
Ya	2 (33,3)	4 (66,7)		

^a = uji Pearson Chi-Square, ^b = uji Fisher, $p < 0,05$ = bermakna secara statistik

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Persentase Penderita KPD yang Mencapai MTC Z-END

Hasil studi ini menunjukkan hanya 52,8% subjek yang mencapai MTC Z-END (5,9 ng/mL) pada penggunaan TAM 20 mg/hari pada saat *steady state*. Beberapa studi potong lintang sudah dilakukan untuk melihat berapa persen penderita KPD yang mengonsumsi TAM 20 mg/hari yang dapat mencapai kadar $\geq 5,9$ ng/mL. Studi yang dilakukan Jager *et al.*¹⁹ di Amsterdam menunjukkan sebanyak 78% pasien mencapai kadar Z-END 5,9 ng/mL, sementara studi yang dilakukan oleh Hennig *et al.*⁴³ di Polandia menunjukkan sebanyak 40,1% pasien mempunyai kadar Z-END di atas 5,9 ng/mL. Persentase subjek KPD pada studi ini yang mencapai MTC Z-END lebih tinggi dibandingkan studi yang dilakukan oleh Hennig *et al.*,⁴³ namun lebih rendah dibandingkan studi yang dilakukan oleh Jager *et al.*¹⁹

Medlensky *et al.*¹⁷ menunjukkan 30% lebih tingginya risiko relaps pada pasien KPD dengan ER positif yang memiliki kadar Z-END $< 5,97$ ng/mL ($< 14,2$ nM). Saladores *et al.*¹²⁰ menunjukkan lebih tingginya relaps jangka panjang pada pasien dengan kadar Z-END yang rendah (5,08 ng/mL atau $< 14,15$ nM) vs. tinggi (12,72 ng/mL atau > 35 nM). Helland *et al.*¹⁴⁶ menunjukkan kadar Z-END yang rendah ($< 3,27$ ng/mL atau $< 9,00$ nM) mempunyai *breast cancer specific survival* pada tahun ketiga lebih tinggi sebesar 27% vs. tinggi ($\geq 3,27$ ng/mL atau $\geq 9,00$ nM). Berbeda dengan studi-studi di atas yang menunjukkan tingginya rekurensi pada subjek dengan kadar END yang rendah, studi yang dilakukan oleh Love *et al.*¹²¹ menunjukkan kadar Z-END > 70 ng/mL dihubungkan dengan lebih tingginya rekurensi. Studi-studi tersebut menunjukkan rekurensi KPD tidak hanya dapat terjadi pada END kadar rendah tapi juga dapat terjadi pada kadar tinggi.

Beberapa studi *in vitro* mendukung bahwa kadar END secara substansial ikut berkontribusi untuk efektivitas TAM. END menyebabkan degradasi ER α oleh proteosom dalam sel KPD pada kadar tinggi (100–1.000 nM/L), namun tidak terjadi pada kadar rendah (20–40 nM/L).⁹⁸ Kemampuan END menginduksi penghentian pembelahan KPD pada sel kultur MCF-7 dan apoptosis terjadi pada kadar tinggi (100–1000 nM) berbeda dengan antiestrogen lainnya.¹¹³ Murdler *et al.*¹¹⁹

menunjukkan dibutuhkan kadar END 4,7 ng/mL agar dapat menghambat 90% ER (IC₉₀). Hingga saat ini belum diketahui pasti berapa kadar Z-END yang dapat digunakan sebagai acuan untuk menekan rekurensi, namun tampaknya diperlukan *therapeutic threshold concentration* tertentu bagi Z-END untuk menentukan keberhasilan terapi.¹⁴⁷

Ada banyak faktor yang menyebabkan perbedaan hasil studi ini dengan studi lainnya antara lain polimorfisme genetik dalam enzim pemetabolisme TAM. Metabolisme TAM bersifat kompleks karena melibatkan banyak isoform sitokrom P450. Z-END merupakan metabolit TAM paling aktif yang dibentuk terutama melalui perantaraan CYP2D6. Adanya polimorfisme genetik CYP2D6 selama ini digunakan sebagai faktor prediktor dalam metabolisme TAM menjadi metabolit aktifnya dan dalam respons terapi.¹⁴⁸

Frekuensi alel berbeda antar etnik, alel CYP2D6*10 (alel dengan fungsi berkurang) sering ditemukan pada populasi Asia (40%), sementara alel CYP2D6*4 (alel non-fungsional) lebih sering ditemukan pada populasi Kaukasia (11,7%), namun di Asia sangat jarang ditemukan (< 1%).⁸⁹ Adanya perbedaan etnik antara subjek Indonesia (Asia) dan Kaukasia juga membawa dampak dalam perbedaan kadar Z-END dalam plasma.

Median (25–75%) kadar Z-END dalam plasma pada subjek studi adalah 6,63 (3,18–10,56) ng/mL. Kesulitan dalam membandingkan hasil studi ini dengan studi lainnya adalah tidak normalnya distribusi kadar Z-END menyebabkan kadar Z-END dipresentasikan sebagai median (25–75%) sementara studi lainnya menggunakan rerata ± SB kadar Z-END, selain itu studi ini secara spesifik hanya mengukur Z-END sementara banyak studi yang sudah dilakukan mengukur total END (E- dan Z-END). Hasil studi ini konsisten dengan studi Antunes *et al.*²⁷ yang menunjukkan median kadar END pada subjek KPD di Brazil sebesar 6,21 ng/mL.

Beberapa studi lain yang dilakukan pada etnik Kaukasia menunjukkan rerata kadar Z-END berkisar dari 4,8–84,1 ng/mL.^{19, 43, 149}

Median (min–maks) lama konsumsi TAM subjek studi adalah 16 (4–90) bulan. *Steady state concentration* (C_{ss}) Z-END dalam plasma berhubungan dengan lama terapi TAM. Sudah merupakan *rule of thumb* bahwa C_{ss} suatu obat dalam darah

akan tercapai dalam waktu 5 kali waktu paruh ($t_{1/2}$).¹⁵⁰ Berdasarkan $t_{1/2}$ metabolit primernya (± 14 hari),⁹¹ maka diperkirakan C_{ss} Z-END sudah dapat tercapai $\pm 2,5$ bulan, namun Jin *et al.*¹⁶ menyatakan diperlukan waktu 4 bulan bagi Z-END untuk mencapai C_{ss}. Berdasarkan Jin *et al.*¹⁶ maka kriteria inklusi subjek penelitian ini adalah penderita KPD yang sudah mengonsumsi TAM secara terus menerus ± 4 bulan untuk memastikan kadar Z-END sudah mencapai C_{ss}. Berdasarkan informasi di atas maka lama terapi pada studi ini sudah mencukupi untuk memastikan Z-END sudah mencapai C_{ss}.

Rentang kadar Z-END terendah dan tertinggi dalam plasma pada subjek studi ini adalah 0,7–36,6 ng/mL. Kadar Z-END dalam plasma memperlihatkan variasi interindividual sebesar 52,3 kali lipat antar subjek. Hasil studi ini konsisten dengan studi Fotoohi *et al.*,¹⁸ Murdter *et al.*,¹¹⁹ dan Woo *et al.*¹⁵¹ yang juga memperlihatkan tingginya variasi interindividual kadar END plasma pada subjek yang mengonsumsi TAM 20 mg/hari.

Selain faktor genetik yang dipengaruhi oleh etnik, faktor lingkungan juga dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma. Estrogen dapat menyebabkan terjadinya kolestasis intrahepatik pada perempuan pramenopause yang menggunakan kontrasepsi oral, atau pada perempuan pascamenopause yang memperoleh terapi sulih hormon.

Koh *et al.*¹⁵² dan Pan *et al.*¹⁵³ menunjukkan pemberian 17 α -etinilestradiol pada hewan coba CYP2D6-*humanized transgenic* (Tg-CYP2D6) dapat menginduksi terjadinya kolestasis sehingga akan mengaktivasi reseptor asam empedu *farnesoid X receptor* (FXR) diikuti dengan peningkatan ekspresi *small heterodimer partner* (SHP) yang akan merepresi transaktivasi *hepatocyte nuclear factor* (HNF)4 α dari promotor CYP2D6 sehingga terjadi represi ekspresi CYP2D6.^{152, 153} Efek ini tidak hanya terjadi pada dosis tinggi tapi juga terjadi pada dosis rendah (yang tidak menyebabkan kolestasis). Paparan estrogen tersebut akan meningkatkan SHP (hingga $\sim 50\%$) dan mengurangi ekspresi gen CYP2D6 (hingga 1,5 kali).¹⁵³ Variasi kadar Z-END antar subjek pada studi ini mungkin salah satunya bisa disebabkan oleh terjadinya kolestasis akibat asupan hormon estrogen dari penggunaan kontrasepsi hormonal atau dari sumber lainnya.

5.2 Genotyping Gen CYP2D6*10 (c.100C>T)

Alel CYP2D6*10 merupakan alel yang sering ditemukan pada etnik Asia.¹⁵⁴ Alel CYP2D6*10 dihasilkan dari transisi c.100C>T di dalam exon 1 menyebabkan substitusi asam amino prolin 34 menjadi serin (Pro34Ser) akan menghasilkan enzim yang tidak stabil dengan aktivitas enzim yang rendah (PM).¹⁵⁵

Metaanalisis bertujuan mengevaluasi efek polimorfisme CYP2D6*10 (c.100C>T, rs1065852) terhadap *outcome* klinis pasien KPD etnik Asia yang memperoleh terapi adjuvan TAM menunjukkan adanya hubungan bermakna antara genotip *10/*10 (T/T) dengan DFS dan rekurensi.¹⁵⁶

Hasil studi ini menunjukkan persentase genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) homozigot mutan (T/T) merupakan genotip yang terbanyak yaitu sebesar 48.0%, diikuti heterozigot mutan (C/T) yaitu sebesar 29.6%, dan homozigot *wild-type* (C/C) yaitu sebesar 22.4%.

Berbeda dengan hasil studi ini, persentase genotip terbanyak di Filipina dan Cina adalah C/T dengan persentase masing-masing sebesar 56%,¹⁵⁵ dan 43%.³⁴ Hasil studi ini mengonfirmasi walaupun sesama etnik Asia prevalensi CYP2D6*10 (c.100C>T) berbeda antar etnik. Subjek KPD di Indonesia perlu mendapat perhatian lebih karena berbeda dengan kedua studi di atas, di Indonesia persentase terbesar penderita KPD yang mendapatkan TAM adalah genotip T/T (48%).

Hasil studi ini menunjukkan median (25–75%) kadar Z-END pada genotip C/C, C/T, dan T/T masing-masing 9,58 (0,7–6,0) ng/mL, 9,86 (0,7–26,6) ng/mL, dan 3,76 (0,9–26,6) ng/mL. Median kadar Z-END dalam plasma pada genotip T/T secara bermakna paling rendah dibandingkan ke-2 genotip lainnya ($p < 0,001$). Berdasarkan hasil studi ini dapat dilihat bahwa subjek yang memiliki genotip C/T tidak mengubah kadar Z-END dalam plasma secara bermakna, sebaliknya pada subjek dengan genotip T/T dapat mengubah kadar Z-END dalam plasma secara bermakna.

Tidak banyak studi yang membandingkan kadar END berdasarkan genotip CYP2D6*10 (c.100C>T). Studi yang dilakukan di Cina oleh Lei *et al.*³⁴ menunjukkan hasil yang sama dengan hasil penelitian ini yaitu kadar genotip T/T memiliki kadar END secara bermakna paling rendah dibandingkan kedua genotip

lainnya. Median kadar Z-END pada genotip T/T pada studi ini sebesar 3,76 (0,9–26,6) ng/mL, sementara pada studi Lei *et al.*³⁴ rerata $\pm$ SB kadar Z-END adalah (10,72 $\pm$ 4,00 ng/mL). Cukup sulit untuk membandingkan studi ini dengan studi yang dilakukan oleh Lei *et al.*³⁴ karena adanya perbedaan dalam distribusi data yang menyebabkan timbulnya perbedaan dalam presentasi data yang diberikan (median vs. rerata). Walaupun ada perbedaan presentasi data antara studi ini dengan studi Lei *et al.*,³⁴ hasil studi ini menunjukkan bahwa kadar Z-END dalam plasma akan berubah bila substitusi basa/mutasi terjadi pada kedua basa penyusun alel CYP2D6*10 yang fungsional.

Studi yang dilakukan oleh Kiyotani *et al.*¹⁵⁷ di Jepang bertujuan melihat hubungan genotip CYP2D6*10 terhadap kadar END. Median kadar END pada wt/wt (*wild-type/wild-type*), wt/V (*wild-type/variant*), dan V/V (*variant/variant*) masing-masing sebesar 35,4 ng/mL, 27,2 ng/mL, dan 15,5 ng/mL. Konsisten dengan hasil studi ini, Kiyotani *et al.*¹⁵⁷ juga menunjukkan ada perbedaan bermakna pada kadar END dengan kadar terendah ditunjukkan pada genotip V/V ($p = 0,0000043$).¹⁵⁷

Studi yang dilakukan oleh Love *et al.*¹²¹ pada subjek KPD Filipina dan Vietnam yang mendapatkan terapi adjuvan TAM bertujuan untuk melihat hubungan antara genotip CYP2D6 terhadap kadar END menunjukkan rerata $\pm$ SB kadar END pada alel dengan fungsi normal (*1,*2) adalah 48,2 $\pm$ 39,7 ng/mL, alel dengan fungsi berkurang (heterozigot *10, *41) adalah 39,3 $\pm$ 26,6 ng/mL, dan alel dengan aktivitas buruk (homozigot *10, *41, dan satu atau lebih alel nonfungsional/nul alel) adalah 24,0 $\pm$ 22,3 ng/mL. Studi tersebut menunjukkan ada perbedaan bermakna kadar END dengan kadar terendah pada alel dengan aktivitas buruk/nonfungsional ($p < 0,0001$)

Studi yang dilakukan oleh Lei *et al.*,³⁴ Kiyotani *et al.*,¹⁵⁷ dan Love *et al.*¹²¹ dilakukan pada subjek dari Asia. Adanya perbedaan kadar Z-END dapat disebabkan adanya perbedaan etnik yang menyebabkan terjadinya polimorfisme CYP2D6*10. Perbedaan lainnya adalah ketiga studi yang dilakukan tersebut mengukur total END (isomer E- dan Z-END), sementara kita tahu bahwa isomer E-END merupakan agonis lemah dengan afinitas $< 1\%$ pada ER dibandingkan dengan isomer Z-END. Studi yang dilakukan pada subjek KPD di Indonesia ini mengukur kadar Z-END secara spesifik, sementara studi yang dilakukan oleh Kiyotani *et al.*¹⁵⁷ mengukur

CYP2D6*10 pada kedua alel, studi yang dilakukan oleh Love *et al.*¹²¹ tidak hanya spesifik pada *10, sementara pada studi yang dilakukan ini dan studi Lei *et al.*³⁴ hanya mengukur mutasi pada 1 alel yaitu CYP2D6*10 (c.100C>T) seperti halnya pada studi ini. Terlepas dari adanya perbedaan di antara studi yang ada, konsisten dengan studi yang telah dilakukan sebelumnya studi ini juga menunjukkan adanya perbedaan kadar END antar ke-3 genotip.

5.3 Hubungan Genotip Gen CYP2D6*10 (c100C>T) dengan Kadar Z-END Plasma

Berdasarkan fungsinya dalam metabolisme TAM menjadi Z-END, genotip T/T diperkirakan akan memiliki kadar Z-END lebih rendah dari C/C atau C/T karena fungsinya dalam metabolisme tidak optimal.

Hasil studi ini menunjukkan sebanyak 46 subjek (76,7%) genotip T/T mempunyai kadar Z-END < 5,9 ng/mL, namun ada 14 subjek (23,3%) genotip T/T memiliki kadar Z-END di atas MTC Z-END. Hasil studi ini konsisten dengan studi yang dilakukan oleh Fox *et al.*¹²⁸ yang menunjukkan subjek dengan PM CYP2D6 genotip umumnya memiliki kadar Z-END < 5,9 ng/mL, namun sama seperti hasil studi ini ada sebagian subjek dengan PM CYP2D6 memiliki kadar END > 5,9 ng/mL (> 15 nM/L). Hasil studi ini menunjukkan walaupun sebagian besar subjek studi dengan genotip T/T mempunyai kadar Z-END di bawah MTC, genotip tidak bisa sepenuhnya menjelaskan variabilitas kadar Z-END pada subjek studi.

Analisis bivariat menunjukkan ada hubungan bermakna secara statistik antara genotip dengan pencapaian kadar Z-END ($p < 0,001$) (Tabel 4.2.). Hasil penelitian ini konsisten dengan Antunes *et al.*²⁷ dan Schroth *et al.*¹⁵⁸ yang mendukung bahwa polimorfisme genotip CYP2D6 hanya dapat menjelaskan 12–58% dari variabilitas kadar Z-END pada saat *steady-state*.

Ada multipel faktor yang dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma selain genotip CYP2D6 antara lain penggunaan TAM bersama dengan obat lain seperti paroxetin/fluoksetin,^{16, 26} rifampisin,²⁵ dan *adherence* juga dapat memengaruhi kadar Z-END.

Fenomena yang menjelaskan subjek dengan genotip T/T memiliki kadar Z-END > 5,9 ng/mL tampaknya berkaitan dengan peran isoform sitokrom P450 lainnya

ditunjukkan pada studi-studi *in vitro* di bawah ini. Desta *et al.*¹³ menunjukkan peran eksklusif CYP2D6 di dalam transformasi metabolik dari N-desmetil-TAM menjadi END. Jin *et al.*¹⁶ menunjukkan CYP2D6 mempunyai kontribusi sebesar 50% di dalam metabolisme TAM menjadi END.¹⁶ Studi Murdter *et al.*¹¹⁹ menunjukkan selain CYP2D6, CYP2C9 juga mempunyai peran dalam pembentukan END melalui N-demetilasi dari 4-hidroksi-TAM yang merupakan 20–30% sumber dari Z-END. CYP3A4 paling sedikit memberikan kontribusi sebesar 20–30% dalam pembentukan END dari biotransformasi dari hidroksi-TAM.¹¹⁹ Hasil studi yang dilakukan oleh Murdter *et al.*¹¹⁹ menunjukkan tidak ditemukan hubungan antara varian CYP2D6, CYP2C19, dan CYP3A5 dengan kadar Z-END, namun CYP2C9 (*2,*3) yang merupakan alel dengan fungsi berkurang mempunyai kadar Z-END yang rendah ($p < 0,004$). Studi-studi tersebut menunjukkan diperlukan jalur metabolisme lainnya selain CYP2D6 dalam pembentukan END.

Studi pada manusia mengonfirmasi hasil studi *in vitro* dalam hal adanya keterlibatan sitokrom P450 selain CYP2D6 yang dapat memengaruhi kadar END antara lain oleh CYP3A4. Teft *et al.*²³ menunjukkan lebih tingginya kadar Z-END pada pasien karier alel CYP3A4*22 dengan risiko 2 kali lipat lebih rendah untuk mempunyai kadar Z-END subterapeutik. Studi yang dilakukan Antunes *et al.*¹⁵⁹ menunjukkan pasien dengan gangguan aktivitas metabolisme CYP2D6 dan karier CYP3A4*22 mempunyai kadar END sebanding dengan EM CYP2D6. Keberadaan CYP3A4*22 dapat mengkompensasi kurangnya kadar END akibat inaktivitas CYP2D6, terutama karena peningkatnya kadar hidroksi-TAM.¹⁵⁹ Kedua studi tersebut menunjukkan walaupun CYP2D6 merupakan enzim utama dalam pembentukan END, pada kondisi berkurangnya aktivitas CYP2D6, alel *22 dari CYP3A4 tampaknya mengompensasi sebagian gangguan metabolisme CYP2D6.

Eliminasi TAM secara primer terjadi melalui metabolisme oksidatif di hepar, dan sekitar 75% dari dosis diekskresi ke dalam traktus biliaris sebagai glukuronida.²¹ Eliminasi TAM dan metabolitnya 4-OH-TAM dan END via glukuronidase yang dikatalisis oleh *uridine-5'-diphospho-glucuronosyltransferase* (UGT). Selain mengalami N-glukuronidase, enzim hati utama yang terlibat dalam O-glukuronidase dari (E)- dan (Z)- isomer END adalah UGT2B7 dan UGT2B15. Ekspresi UGT2B15 dilaporkan 4 kali lebih tinggi dibandingkan UGT2B7.¹⁶⁰

Chanawong *et al.*¹⁶¹ menunjukkan pada sel kultur MCF7, sama halnya dengan 17β -estradiol maka END dapat menstimulasi ekspresi UGT2B15 mRNA sehingga akan meningkatkan metabolisme lokal dan inaktivasi END dan mengurangi efikasi TAM. Sutiman *et al.*¹⁶² menunjukkan UGT2B7 dan UGTB15 mempunyai efek minor dalam hubungannya dengan kadar Z-END dalam plasma. UGT1A4*3 (142T>G, L84V) dihubungkan dengan lebih tingginya kadar metabolit aktif TAM-N-*glucuronide* secara bermakna.¹⁶²

Berbeda dengan hasil studi di atas, studi yang dilakukan Murdter *et al.*¹¹⁹ menunjukkan tidak ada korelasi genotip UGT2B7, UGT2B15*2, maupun UGT1A4 dengan kadar Z-END dalam plasma. Studi yang dilakukan oleh Murdter *et al.*¹¹⁹ pada etnik Kaukasia, sementara studi yang dilakukan Sutiman *et al.*¹⁶² pada penderita KPD dari etnik Asia (Cina, Melayu, dan India). Berdasarkan hasil studi di atas dapat disimpulkan bahwa faktor etnik tampaknya ikut berkontribusi dalam ekspresi enzim UGT.

Hasil studi ini dapat dilihat median kadar Z-END pada genotip T/T sebesar 3,76 ng/mL adalah di bawah MTC Z-END yang ditetapkan berdasarkan studi Madlensky *et al.*¹⁷ Hingga saat ini belum diketahui pasti apakah MTC Z-END tersebut akan memengaruhi efikasi TAM pada penderita KPD di Indonesia, dan berapa target kadar Z-END dalam plasma pada populasi Indonesia. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut berkaitan dengan hal ini.

Perlu disadari bahwa kadar obat dalam darah tidak hanya dipengaruhi genotip CYP2D6, tapi juga ada faktor lain misalnya obat-obat lain yang diminum bersamaan dengan TAM dan *adherence*.¹⁴⁷ Pada studi ini obat-obat lain yang dikonsumsi pada saat pengambilan data dan *adherence* ikut dicatat namun, tidak dilaporkan pada studi yang dilakukan oleh Lei *et al.*³⁴

Hingga saat ini masih belum jelas apakah efikasi terapi TAM dipengaruhi oleh kadar END. Beberapa studi menunjukkan pasien KPD yang memiliki kadar Z-END < 5,9 ng/mL mengalami peningkatan risiko rekurensi KPD.^{17, 120} Berkaitan dengan target kadar Z-END, beberapa studi melakukan eskalasi dosis TAM menggunakan acuan genotip CYP2D6 atau kadar END dalam darah. Pada subjek dengan aktivitas berkurang (PM/IM) peningkatan dosis dari 20 mg menjadi 40 mg menunjukkan

terjadi peningkatan kadar END tanpa meningkatkan efek samping.^{102, 125, 126, 130} Martinez de Duenas *et al.*¹²⁹ melakukan peningkatan dosis TAM dari 20 mg ke 40–60 mg pada pasien PM dapat meningkatkan kadar END 2 hingga 3 kali lipat sebanding dengan EM, namun ada 1 orang (menggunakan dosis TAM 40 mg/hari) dihentikan dari studi karena mengalami perdarahan uterus akibat hiperplasia polip endometrial.

Berbeda dengan studi Martinez de Duenas *et al.*¹²⁹ yang menggunakan acuan genotip CYP2D6 sebagai dasar peningkatan dosis, studi yang dilakukan Fox *et al.*¹²⁸ mendukung peningkatan dosis berdasarkan kadar END dalam plasma saja tanpa perlu dilakukannya pemeriksaan genotip CYP2D6.

Pemilihan sumber garis germinal (*germline*) untuk *genotyping* CYP2D6 dapat memengaruhi frekuensi genotip. Pada penderita KPD diketahui terdapat instabilitas kromosom akibat delesi alel pada kromosom 22q13, daerah di mana terletak gen CYP2D6.¹⁶³ Penggunaan *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) dari jaringan tumor payudara sebagai materi *germline* untuk genotip CYP2D6 dapat mengakibatkan misinterpretasi data karena hilangnya heterozigositas pada lokus CYP2D6 sampel sehingga menyebabkan deviasi dari prinsip Hardy-Weinberg.¹⁶⁴ Pada studi ini materi *germline* diperoleh dari darah, sehingga diharapkan tidak ada bias dalam melakukan pengukuran genotip CYP2D6*10.

*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy*¹⁶⁵ saat ini mengeluarkan rekomendasi pada perempuan pascamenopause dengan IM CYP2D6 dan CYP2D6*10/*10 atau CYP2D6*10/alel dengan fungsi berkurang dipertimbangkan untuk penggunaan terapi hormon alternatif (misalnya: AI), sementara pada perempuan pramenopause direkomendasikan penggunaan AI bersama dengan supresi fungsi ovarium. Pada IM CYP2D6 bila AI dikontraindikasikan maka dipertimbangkan untuk memberikan TAM dosis 40 mg/hari (dosis tertinggi yang disetujui oleh FDA), yang diketahui akan meningkatkan kadar END tanpa meningkatkan toksisitas.^{130, 165}

Aromatase (CYP19A1) merupakan enzim yang terlibat di dalam biosintesis estrogen, sehingga dipakai sebagai terapi alternatif pada kanker payudara yang tergantung dari estrogen, dan direkomendasikan oleh CPIC *guideline*¹⁶⁵ sebagai

alternatif TAM pada subjek dengan polimorfisme CYP2D6. Ada 88 polimorfisme CYP19A1 yang menghasilkan 44 haplotypes dan 4 tipe varian alel utama yang telah ditemukan saat ini.¹⁶⁶

Studi yang dilakukan oleh Colomer *et al.*¹⁶⁷ pada pasien KPD metastasis dengan reseptor hormon positif menunjukkan *single nucleotide polymorphism* pada *non-coding area* di dalam gen aromatase CYP19 berhubungan dengan efikasi letorazole pada pasien kanker payudara. *Time to progression* subjek dengan varian CYP19 rs4646 SNP lebih panjang secara bermakna dibandingkan *wildtype* ($p = 0,02$).¹⁶⁷ Efektivitas AI tampaknya dipengaruhi juga oleh polimorfisme genetik yang masih perlu diteliti pada subjek Indonesia.

5.4 Phenotyping CYP2D6

DMP merupakan *probe drug* yang banyak digunakan untuk menilai aktivitas metabolik CYP2D6 *in vivo* karena ketersediaannya.⁴¹ Metoda penentuan aktivitas metabolik CYP2D6 (*phenotyping*) yang lazim dikerjakan untuk membedakan antara EM dan PM adalah dengan menggunakan MR DMP/DX urin 4–8 jam.^{134, 168} Mengumpulkan urin 4–8 jam tidak bersifat invasif, namun ada bagi pasien rawat jalan tindakan ini tidak nyaman dan memakan banyak waktu.

Phenotyping CYP2D6 pada studi ini menggunakan DMP 30 mg per oral dosis tunggal, kemudian ditentukan MR DMP/DX dalam plasma 3 jam pasca minum DMP. Studi yang dilakukan Borges *et al.*¹⁶⁹ menunjukkan MR DMP/DX urin tidak dapat digunakan untuk mendeteksi aktivitas metabolik CYP2D6 karena tidak mencerminkan *clearance* DMP yang diberikan peroral, dan dibutuhkan jumlah subjek yang besar (524 orang) untuk studi *cross-sectional* (*effect size* 30)

Pada studi ini nilai median (25–75%) MR DMP/DX adalah 0,91 (0,43–3,15) dengan perbedaan yang sangat mencolok dari nilai terendah (0,13) dan tertinggi (176,0). Adanya variasi interindividual yang besar pada kadar DMP (0,68–52,52 ng/mL) dan DX (0,25–15,6 ng/mL) menyebabkan MR DMP/DX bervariasi besar konsisten dengan studi yang dilakukan sebelumnya oleh Antunes *et al.*,²⁷ dan Pfaff *et al.*¹⁷⁰

Studi *in vitro* yang dilakukan oleh von Moltke *et al.*¹⁷¹ menunjukkan CYP2D6 memberikan kontribusi sebesar 83,1% dalam pembentukan DX, sementara CYP2D9 (13,3%), dan CYP2C19 (3,6%). Pada kadar DMP < 5 $\mu\text{mol/L}$ (1,85 ng/mL), CYP2D6 diprediksi berperan dalam > 70% pembentukan DX, saat konsentrasi DMP meningkat 30–40 $\mu\text{mol/L}$ (11,1–14,8 ng/mL) maka CYP2C9 menjadi isoform CYP dominan yang bertanggungjawab dalam pembentukan DX. Hasil studi di atas menunjukkan besarnya dosis DMP yang diberikan menentukan isoform yang berperan dalam pembentukan DX.

Studi yang dilakukan oleh Streetman *et al.*¹⁷² membandingkan beberapa dosis DMP (56 mg, 84 mg, vs. 30 mg) dan melihat apakah akan terjadi saturasi CYP2D6 pada metabolisme lintas pertamanya di hepar (*hepatic first-pass metabolism*) pada peningkatan dosis DMP. Hasil studi tersebut menunjukkan terjadi peningkatan kadar DMP dalam plasma pada penggunaan dosis lebih besar dari 30 mg (*dose dependency metabolism*) dan mendukung penggunaan DMP dosis 30 mg (0,05–0,3 mg/kg) untuk *phenotyping*.

Pada subjek dengan genotip yang sama dapat dilihat adanya variasi MR DMP/DX. Yang perlu dipahami *phenotyping* tidak mutlak dipengaruhi oleh faktor genetik tetapi juga dipengaruhi oleh faktor non-genetik yang dapat memengaruhi farmakokinetik obat antara lain: aliran darah ke hati, ikatan protein, distribusi setelah metabolisme dan ekskresi renal juga dapat menyebabkan bervariasinya MR DMP/DX.

Pada studi ini ada 4 subjek yang kadar DX dalam plasmanya tidak dapat terdeteksi karena ada di bawah LLOQ (0,5 ng/mL). Pada ke-4 subjek ini diambil nilai 1/2 LLOQ (0,25 ng/mL) sebagai kadar DX supaya memiliki nilai MR DMP/DX. Ada beberapa hal yang mungkin dapat menyebabkan tidak terdeteksinya kadar DX dan sudah berusaha dipikirkan sebelum pelaksanaan studi salah satunya adalah penentuan waktu pengambilan sampel darah dan besar dosis DMP yang akan digunakan.

Penentuan fenotip berdasarkan MR DMP/DX, maka penentuan waktu pengambilan sampel darah sudah mempertimbangkan farmakokinetik DMP dengan mengingat kadar puncak tercapai dalam waktu $\pm 2,5$ –3 jam, dengan waktu paruh berkisar 2–4

jam,¹³² maka waktu pengambilan darah yang terlalu lama atau cepat akan mengakibatkan kadar DX menjadi sangat rendah atau bahkan sudah tidak dapat dideteksi karena sudah dieliminasi dari tubuh mengingat obat ini hanya diberikan dosis tunggal. Pada subjek dengan aktivitas CYP2D6 yang fungsional maka besarnya dosis *parent drug* (DMP) akan memengaruhi jumlah metabolit DX yang terbentuk. Dosis yang terlalu rendah dikhawatirkan kadar DX tidak dapat terdeteksi melalui alat pengukuran.

Titik potong fenotip studi ini hanya bisa membedakan fenotip subjek studi ke dalam PM dan nonPM, namun tidak berhasil menemukan fenotip IM. Tidak tampaknya distribusi bimodal pada kelompok EM dan IM pada penderita KPD di Indonesia disebabkan *probe drug* yang digunakan pada studi ini tidak mempunyai daya diskriminasi yang cukup untuk membedakan fenotip EM dan IM pada populasi studi karena metabolisme *probe drug* tersebut tidak murni diperantarai oleh CYP2D6 tapi juga melibatkan banyak enzim sitokrom yang lain.

Nilai titik potong fenotip PM dan non-PM pada studi ini ditentukan menggunakan ROC yaitu sebesar 1,01. Nilai titik potong pada studi ini berbeda dengan studi lain yang sudah dilakukan sebelumnya pada etnik yang berbeda. Beberapa studi sudah dilakukan untuk mencari nilai titik potong fenotip EM dan PM menggunakan dosis, sediaan DMP, dan waktu pengambilan sampel darah yang bervariasi.

Studi yang dilakukan oleh Kohler *et al.*¹⁷³ menggunakan larutan yang mengandung DMP 20 mg, sampel plasma diambil 1 jam dan menggunakan nilai titik potong fenotip EM dan PM (0,01–2,53). Shiran *et al.*¹⁷⁴ menggunakan kapsul DMP 15 mg dan sampel plasma diambil 3 jam pasca dosis, dan menggunakan nilai titik potong 0,1 sebagai antimode untuk membedakan fenotip EM dan PM. Chladek *et al.*¹³⁴ menggunakan dosis DMP 30 mg dalam formula sirup obat batuk, sampel plasma diambil 3 jam pasca dosis, dan melihat korelasi antara MR DMP/DX urin 4 jam dan plasma 3 jam. Jurica *et al.*¹⁶⁸ menggunakan dosis DMP 30 mg dalam sirup obat batuk, sampel serum diambil 3 jam pasca dosis, dan menggunakan ROC dengan nilai titik potong untuk membedakan IM+PM dari EM adalah 0,02081 (spesifisitas 70,03%, sensitivitas 70,37%), EM dari IM saja 0,0206 (spesifisitas 70,83%, sensitivitas 61,9%), IM dari PM antara 0,215 dan 0,742 (sensitivitas dan

spesifisitas 100%), PM dari IM + EM dalam rentang 0,21–0,742 (sensitivitas dan spesifisitas 100%).

Perbedaan titik potong fenotip hasil studi ini dengan studi lainnya sudah bisa diprediksi karena sama seperti halnya TAM, DMP juga dimetabolisme oleh CYP2D6 yang sudah diketahui aktivitasnya berbeda-beda tergantung etnik.

Pada studi ini pada penggunaan DMP 30 mg per oral dosis tunggal secara umum dapat ditoleransi pada 120 subjek (96,8%). Terdapat laporan *adverse events* (AE) pada 5 subjek (3,2%) berupa pusing, mual disertai buang air besar cair yang hilang dalam waktu $\pm$ 3–5 jam.

Dosis DMP sebagai antitusif untuk orang dewasa yang disetujui penggunaannya adalah sebesar 15–30 mg yang diberikan 3–4 kali sehari.¹³² Pada studi ini penggunaan dosis DMP 30 mg per oral dosis tunggal masih relatif aman untuk diberikan pada subjek studi karena masih dalam rentang dosis yang direkomendasikan sebagai antitusif. Pada rentang dosis yang direkomendasikan AE yang dilaporkan < 1% (antara lain: pusing, mengantuk, mual, gangguan gastrointestinal, dan lain-lain)¹³²

Adverse events yang dialami subjek yang mengonsumsi DMP tampaknya ada hubungannya dengan besarnya dosis DMP yang diberikan. Funck-Brentano *et al.*¹⁷⁵ menggunakan DMP 80 mg untuk *phenotyping* menunjukkan sebanyak 16,5% orang mengalami ADR berupa pusing, mual, mengantuk atau gangguan gastrointestinal.¹⁷⁵ Mortimer *et al.*¹⁷⁶ menggunakan DMP 120 mg yang diberikan dalam dosis terbagi dalam 5 jam (dosis harian tertinggi yang direkomendasikan oleh *physicians drug reference*/PDR Swedia) untuk *phenotyping* menunjukkan 12 dari 29 subjek mengalami ADR berupa pusing, vertigo, ataksia, kecemasan, dan muntah.

Studi yang dilakukan oleh Funck-Brentano *et al.*¹⁷⁵ menunjukkan prediktor *adverse events* yang berhubungan secara bermakna setelah pemberian DMP adalah MR DMP/DX dan fenotip PM. Pada studi ini kelima subjek yang mengalami ADR memiliki MR DMP/DX berkisar 0,6–3,89, sementara nilai median (min–maks.) MR DMP/DX subjek studi adalah 0,91(0,22–89,79). Ditemukan kedua fenotip pada kelima subjek yang mengalami ADR. Tidak diketahui pasti apakah ada hubungan

antara MR DMP/DX terhadap timbulnya ADR pada studi ini. Masih yang diperlukan penelitian lebih lanjut berkaitan dengan hal ini.

5.5 Hubungan Fenotip CYP2D6 terhadap Pencapaian Kadar Z-END

Pada studi ini terlihat adanya perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap median (25–75%) kadar Z-END berdasarkan kelompok fenotip. Fenotip PM yaitu sebesar 3,32 (0,8–11,3) ng/mL dan non-PM sebesar 9,81 (0,7–36,6) ng/mL; ($p < 0,001$). Median kadar Z-END pada fenotip PM adalah di bawah MTC Z-END yaitu 5,9 ng/mL.

Hasil studi ini menunjukkan sebanyak 82,0% subjek dengan fenotip PM dan 14,1% subjek fenotip non-PM memiliki kadar Z-END plasma di bawah MTC. Hasil analisis bivariat menunjukkan terdapat hubungan yang bermakna secara statistik antara fenotip dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma ($p < 0,001$) (Tabel 4.2.). Hasil studi ini sesuai dengan hipotesis studi, dan konsisten dengan studi Antunes *et al.*²⁷ yang menunjukkan ada hubungan antara bermakna antara fenotip terhadap kadar Z-END plasma dengan kadar terendah dimiliki oleh fenotip T/T.

Berdasarkan hipotesis fenotip PM dan genotip T/T seharusnya memiliki kadar Z-END $< 5,9$ ng/mL, namun ditemukan ketidaksesuaian (*disconcordance*) antara genotip dan fenotip terhadap kadar Z-END. Pada studi ini ditemukan subjek dengan fenotip PM (18,0%) dan genotip T/T (23,3%) memiliki kadar Z-END $\geq 5,9$ ng/mL. Ada perbedaan persentase sebesar 5% lebih besar pada fenotip dalam hal jumlah subjek yang mencapai MTC Z-END dibandingkan genotip. Fenotip tampaknya lebih besar kemampuannya untuk menjelaskan variasi kadar Z-END antar individu. Hasil studi ini konsisten dengan studi yang dilakukan oleh Shiran *et al.*¹⁷⁴ dan Niewinski *et al.*¹⁷⁷ yang juga menunjukkan ada *disconcordance* antara genotip dan fenotip.

5.6 Hubungan Berbagai Variabel Dasar dan Klinik terhadap Kadar Z-END Plasma

5.6.1 Usia

Hasil studi ini menunjukkan rerata $\pm$ SB usia subjek studi adalah $44,5 \pm 7,4$ tahun dengan persentase terbesar adalah non lansia yaitu 119 (95,2%). Hasil studi ini

konsisten dengan studi Lei *et al.*,³⁴ Woo *et al.*,¹⁵¹ dan Kiyotani *et al.*¹⁵⁷ yang telah dilakukan pada subjek Asia bahwa rentang usia penderita KPD berkisar $\pm$ 45–51 tahun. Leong *et al.*¹⁷⁸ menunjukkan ada perbedaan mencolok pada puncak usia kejadian KPD yaitu 40–50 tahun di negara-negara Asia, sementara puncak usia di negara di negara Barat (etnik Kaukasia) adalah 60–70 tahun. Sementara berdasarkan data *the Central for Disease Control and Prevention*¹⁷⁹ dengan subjek etnik Kaukasia terjadi peningkatan prevalensi KPD yaitu mulai dari usia 50 tahun dengan puncak tertinggi pada usia 79 tahun.

Hasil studi ini menunjukkan tidak ditemukan adanya hubungan bermakna secara statistik antara usia dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma ($p < 0,888$). Hasil studi ini berbeda dengan studi Lien *et al.*²¹ dan Wu *et al.*²² yang menunjukkan semakin bertambah usia (usia tua) dihubungkan dengan semakin tingginya kadar serum END plasma pada Css secara bermakna.

Perbedaan hasil studi ini dengan studi yang dilakukan oleh Lien *et al.*²¹ dapat disebabkan adanya perbedaan rentang usia subjek studi. Subjek studi Lien *et al.*²¹ mempunyai median (min–maks) usia: 57 (32–85) tahun, sementara pada studi ini 45 (25–68) tahun, dalam arti usia penderita KPD pada studi ini lebih rendah dibandingkan dengan studi di atas.

TAM merupakan *prodrug* yang harus dimetabolisme oleh CYP2D6 menjadi Z-END. Pada proses penuaan berkurangnya massa hepar dan aliran darah ke hepar termasuk enzim-enzim yang terlibat dalam proses metabolisme fase I (via sitokrom P450)¹⁸⁰ diperkirakan dapat mengganggu konversi TAM menjadi Z-END sehingga mengurangi kadar Z-END dalam plasma. Tidak ditemukan adanya hubungan antara usia tua dengan pencapaian kadar Z-END dapat disebabkan karena kecilnya jumlah subjek lansia pada studi ini yaitu 6 orang (4,8%). Selain itu perlu diingat bahwa proses penuaan tidak sama pada semua individu karena ada faktor lain yang memengaruhi seperti penyakit lain yang diderita (komorbid), dan obat-obat lain yang diminum bersama TAM juga dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma.

5.6.2 Indeks Massa Tubuh dan *Waist/Hip Ratio*

Hasil studi ini menunjukkan rerata $\pm$ SB IMT subjek studi ini adalah $24,5 \pm 3,9$ kg/m². Sebagian besar subjek studi memiliki berat badan lebih (63,2%) dan mengalami obesitas sentral (76,8%). IMT subjek studi ini berbeda dengan IMT subjek studi dari Woo *et al.*¹⁵¹ dengan subjek orang Korea dengan median (kisaran) sebesar 22,9 (16,8–36,4) kg/m². Dalam arti sebagian besar subjek studi ini mempunyai berat badan lebih, sementara subjek studi Woo *et al.*¹⁵¹ mempunyai berat badan normal.

Adiposa dihubungkan dengan meningkatnya risiko KPD dan mortalitas akibat interaksi leptin, insulin, dan berbagai mediator inflamasi yang dapat memengaruhi pertumbuhan KPD.⁷⁹ Tinjauan sistematis dan metaanalisis menunjukkan perempuan pra- dan pascamenopause dengan obesitas (IMT > 30) masing-masing mempunyai risiko relatif 1,75 kali dan 1,34 kali mengalami kematian.⁵

Tinjauan sistematis dan metaanalisis yang dilakukan oleh Chan *et al.*⁵ menunjukkan tiap peningkatan 5 kg/m² peningkatan IMT sebelum, < 12 bulan setelah, dan $\geq$ 12 bulan setelah diagnosis KPD masing-masing meningkatkan risiko sebesar 17%, 11%, dan 8% mortalitas total, dan 18%, 14%, dan 29% dari mortalitas akibat KPD. Sun *et al.*⁸⁰ menunjukkan ada hubungan antara post-diagnosis adiposa dengan survival di mana subjek dengan WHR tinggi ($\geq 0,84$) mempunyai risiko 1,5 kali lebih besar mengalami kematian akibat semua penyebab secara bermakna, namun tidak demikian halnya dengan IMT.

Hasil studi ini menunjukkan subjek dengan berat badan lebih–obesitas lebih banyak yang memiliki kadar Z-END di bawah MTC dibandingkan subjek dengan berat badan normal (48,1% vs. 45,7%), namun tidak bermakna secara statistik ($p = 0,906$). Subjek dengan *waist/hip* ratio tinggi lebih banyak yang memiliki kadar Z-END di bawah MTC dibandingkan dengan *waist/hip* normal (49,5% vs. 40,6%), namun tidak bermakna secara statistik ($p = 0,699$).

Hasil studi ini konsisten dengan studi Wu *et al.*²² yang menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara besarnya IMT dan WHR dengan kadar Z-END, namun berbeda dengan studi Madlensky *et al.*¹⁷ yang menunjukkan IMT yang tinggi dihubungkan dengan lebih rendahnya kadar Z-END secara bermakna.

TAM dan metabolitnya Z-END merupakan obat yang bersifat larut lemak sehingga mempunyai volume distribusi yang luas (50–60 L/kg). Peningkatan komposisi lemak tubuh pada subjek studi akan meningkatkan volume distribusi obat larut lemak dalam hal ini TAM yang akan menyebabkan lebih rendahnya kadar puncak obat dalam darah.

Pada studi ini tidak ditemukan adanya hubungan bermakna antara IMT dan *waist/hip ratio* dengan pencapaian kadar Z-END, namun cukup besarnya persentase subjek studi yang mengalami berat badan lebih/obesitas dan obesitas sentral pada studi ini perlu mendapatkan perhatian khusus.

*The Nutrition and Physical Activity Guidelines for Cancer Survivors*¹⁸¹ saat ini mengeluarkan rekomendasi bagi penderita kanker untuk menghindari peningkatan berat badan dan mempertahankan berat badan normal selama terapi dengan cara pengaturan pola makan dan latihan fisik secara teratur karena adanya *evidence* yang berkaitan dengan rekurensi dan survival pada penderita kanker yang memiliki berat badan lebih/obesitas.

5.6.3 Usia Saat Diagnosis

Hasil studi ini menunjukkan rerata $\pm$ SB usia subjek saat didiagnosis adalah $42,25 \pm 7,0$ tahun. Hasil studi ini konsisten dengan studi yang dilakukan Park *et al.*¹⁸² di Taiwan yang menunjukkan median usia saat diagnosis 45,8 tahun. Sebagian besar subjek studi didiagnosis pada usia dewasa tua ≥ 35 tahun, namun ada 13 subjek (10,4%) yang didiagnosis pada usia < 35 tahun. Usia saat diagnostik merupakan faktor prognostik karena KPD yang didiagnosis pada usia yang lebih muda pada umumnya lebih agresif dan kurang responsif terhadap terapi sehingga mempunyai prognosis yang lebih buruk.^{73, 183, 184} Banyak faktor berperan pada usia saat diagnosis KPD antara lain struktur dari populasi, faktor genetik, dan faktor lingkungan.

5.6.4 Status Menopause

Hasil studi ini menunjukkan sebagian besar subjek studi adalah pramenopause (78,4%). Lebih banyaknya persentase subjek studi pramenopause pada studi ini

disebabkan karena TAM memang terapi hormonal yang direkomendasikan terutama untuk perempuan pramenopause.

Hasil studi ini menunjukkan subjek pramenopause lebih banyak yang mempunyai kadar Z-END di bawah 5,9 ng/nL (51,0% vs. 33,3%), namun perbedaan persentase ini tidak bermakna secara statistik dalam hubungannya dengan pencapaian kadar Z-END ($p = 0,103$). Hasil studi ini berbeda dengan studi Wu *et al.*²² yang menunjukkan perempuan pascamenopause secara bermakna mempunyai kadar END lebih tinggi dibandingkan pramenopause bila diklasifikasikan berdasarkan kelompok usia ($p < 0.009$).

Lien *et al.*¹⁸⁵ menunjukkan ada perbedaan farmakokinetik TAM pada penderita KPD pra- dan pascamenopause dapat menyebabkan meningkatnya beberapa metabolit TAM pada perempuan pascamenopause. Rendahnya kadar Z-END pada subjek pramenopause pada studi ini salah satu penyebabnya dapat karena lebih besarnya IMT subjek pramenopause sehingga dapat mengubah farmakokinetika (volume distribusi) Z-END yang sudah dipaparkan sebelumnya.

Lamanya terapi TAM juga dapat memengaruhi kadar estradiol dalam plasma. Jordan *et al.*¹⁸⁶ dan Lum *et al.*¹⁸⁷ menunjukkan pada penderita KPD yang memperoleh terapi jangka panjang TAM (4–72 bulan) bahwa terjadinya peningkatan kadar estradiol dalam serum, yang mungkin disebabkan oleh hambatan mekanisme umpan balik antar ovarium dan *hypothalamo-pituitary axis*.

Studi yang dilakukan oleh Margolin *et al.*¹⁸⁸ menunjukkan ada perbedaan *outcome* antara perempuan pra- dan pascamenopause. Perempuan pramenopause lebih sering mengalami dampak akibat aktivitas CYP2D6 yang berkurang. Pada umumnya perempuan pramenopause memiliki kadar hormon estrogen dan progesteron lebih tinggi dibandingkan perempuan pascamenopause,¹⁸⁹ sehingga bila ada faktor yang memengaruhi terapi TAM akan lebih menonjol pada perempuan pramenopause.

CYP2C19 selain berperan di dalam metabolisme TAM juga berperan di dalam metabolisme hormon estrogen dan progesteron. Studi kohort yang dilakukan oleh Sim *et al.*¹⁸⁹ menunjukkan respons TAM dipengaruhi oleh kombinasi genotip CYP2C19 dan CYP2D6. Hasil studi tersebut menunjukkan luaran yang buruk dan

lebih tingginya rekurensi terjadi pada subjek dengan aktivitas TAM yang rendah (CYP2D6 PM) dan mempunyai kadar hormon kelamin yang rendah akibat meningkatnya metabolisme CYP2C19 (HR = 2,94; IK95% 1,24–6,97),¹⁸⁹ terutama pada kelompok wanita pramenopase. Berdasarkan hasil studi tersebut dapat dilihat bahwa hormon kelamin merupakan faktor penting dalam modulasi risiko rekurensi KPD, namun karena jumlah subjek wanita pramenopause pada studi tersebut maka peneliti menyarankan diperlukan studi kohort dengan jumlah subjek yang lebih besar untuk mengkonfirmasi hasil studinya.

Berdasarkan kepustakaan pembentukan Z-END dari TAM dan metabolisme hormon estrogen keduanya melibatkan enzim CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4/5, dan SULT1A1.¹⁹⁰ Adanya kesamaan enzim dalam proses metabolisme dapat menyebabkan terjadinya kompetisi antara TAM dengan estradiol membawa dampak berkurangnya kadar Z-END dalam plasma.

Terlepas dari hipotesis di atas, hambatan bersaing (*competitive inhibitor*) dalam enzim yang memetabolisme TAM akan terjadi bila enzim yang memetabolisme obat hanya ada satu dan enzim tersebut mengalami mutasi, substrat yang diberikan dalam jumlah banyak, yang tampaknya agak sulit terjadi pada TAM karena metabolismenya melibatkan banyak enzim sitokrom P-450.

Studi yang dilakukan Meltzer *et al.*¹⁹¹ menunjukkan terjadinya kompetisi dalam enzim mikrosom hati antara TAM dan metabolitnya (N-desmetil dan 4-hidroksi-TAM). Pembentukan metabolit Z-END (4-hidroksi-N-desmetil-TAM) mengalami kedua proses metabolisme di atas.

Pada studi ini tidak dilakukan pengukuran kadar estrogen sebelum dan sesudah terapi TAM, sehingga tidak diketahui pasti apakah ada hubungannya kadar estrogen subjek studi dengan rendahnya kadar Z-END pada subjek pramenopause. Masih belum diketahui pasti apakah keberadaan estradiol dalam tubuh penderita KPD dapat mengurangi pembentukan Z-END karena hambatan bersaing dalam metabolisme obat, dan apakah kompetisi dalam enzim mikrosom hati juga dapat terjadi antara TAM dengan Z-END masih perlu diteliti lebih lanjut.

5.6.5 Waktu Minum Tamoksifen

Hasil studi ini menunjukkan sebagian besar subjek studi mengkonsumsi TAM pada malam hari (64,8%), namun tidak ditemukan hubungan bermakna secara statistik antara waktu minum obat TAM dengan pencapaian kadar Z-END.

Binkhorst *et al.*²⁴ menunjukkan waktu minum obat TAM memengaruhi kadar END di dalam darah. Waktu konsumsi obat pada pagi hari meningkatkan paparan sistemik END sebesar 15% (AUC_{0-24}) dibandingkan bila dikonsumsi malam hari.²⁴ Hasil studi ini menunjukkan waktu minum TAM memberikan kontribusi pada variasi kadar END dalam darah.

TAM merupakan obat yang bersifat lipofilik.⁹¹ Hasil studi Binkhorst *et al.*²⁴ selaras dengan teori yang menyatakan absorpsi obat lipofilik lebih cepat pada pemberian pagi hari, disebabkan secara fisiologi lebih cepatnya waktu pengosongan lambung pada pagi hari dan tingginya sekresi asam lambung pada malam hari akan mengurangi absorpsi obat larut lemak.¹⁹² Hipotesis ini menjelaskan mengapa waktu konsumsi TAM (lipofilik) pada pagi hari dapat menyebabkan lebih tingginya kadar END dibandingkan bila dikonsumsi malam hari.

Ohno *et al.*¹⁹³ menunjukkan adanya variasi diurnal intraindividual sebesar 2,8 kali dalam aktivitas CYP3A4, yang juga terlibat dalam metabolisme TAM. Lebih tingginya kadar Z-END pada konsumsi pagi menimbulkan dugaan bahwa aktivitas CYP2D6 juga dipengaruhi oleh variasi sirkadian.²⁴

5.6.6 Tumor, Nodul, Metastasis dan Stadium KPD

Saat ini sudah diketahui keberadaan ER α , PgR, Ki-67, HER2, sub tipe molekular intrinsik, ukuran tumor, keterlibatan kelenjar getah bening, stadium KPD merupakan faktor prognostik KPD.^{3, 4} Beberapa faktor juga diketahui memiliki peranan sebagai faktor prognostik dan prediktif antara lain ER α , PgR, HER2.^{3, 4}

Hasil studi ini menunjukkan sebagian besar subjek studi memiliki ukuran tumor > 2–5 cm (55,2%), keterlibatan KGB positif (60%). Subjek studi yang mengalami metastasis (12%), dan berada pada stadium dini (57,6%). Hasil studi ini konsisten dengan studi Aryandono *et al.*¹⁹⁴ yang dilakukan di Indonesia, dan Ernst *et al.*¹⁹⁵ di India.

Berbeda halnya dengan hasil studi ini yang menemukan ukuran tumor pada saat terdeteksi kanker payudara paling banyak ($> 2-5$ cm), pada umumnya ukuran tumor pada pasien KPD di negara barat pada saat terdeteksi berukuran < 2 cm, dan tanpa keterlibatan KGB yang disebabkan oleh lebih cepatnya deteksi dini dan program skrining yang dilakukan di negara barat.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

5.6.7 Reseptor Estrogen, PgR, HER-2, Ki-67, dan Subtipe Molekular

Tatalaksana KPD mengacu pada *the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*¹¹ menggunakan klasifikasi subtipe molekular intrinsik KPD (luminal-A-like, luminal-B-like, HER2 positif, dan basal like) yang ditentukan berdasarkan pemeriksaan imunohistokimia dari evaluasi keberadaan ER, PgR, HER-2, dan Ki-67.¹¹

Hasil studi ini menunjukkan seberapa besar subjek studi memiliki ER positif (91,2%), PgR positif (83,2%), HER2 negatif (76,8%), Ki-67 tinggi (54,4%), dengan subtipe molekular terbanyak adalah luminal A (39,2%).

Hasil studi ini konsisten dengan studi yang telah dilakukan sebelumnya pada subjek KPD di Indonesia oleh Setyawati *et al.*¹⁹⁹ dan Widodo *et al.*²⁰⁰ di RS. Dr. Sardjito Yogyakarta yang menemukan subtipe molekular terbanyak adalah Luminal A dengan persentase masing-masing sebesar 41,3% dan 38,1%. Persentase luminal A pada studi ini tampaknya lebih rendah dibandingkan Thailand (59,3%),²⁰¹ Malaysia (48%),²⁰² dan Taiwan (57–67%).²⁰³ Berbeda dengan hasil studi ini subtipe molekular terbanyak di Myanmar adalah luminal B (HER-) sebesar 39,6%.²⁰⁴

Tinjauan sistematik dan metaanalisis yang dilakukan oleh Lambertini *et al.*²⁰⁵ menunjukkan faktor reproduktif berperan dalam risiko timbulnya KPD berdasarkan subtipe. Usia lebih tua pada saat melahirkan meningkatkan risiko KPD subtipe luminal 1,15 kali, sementara paritas, menyusui dihubungkan dengan mengurangi risiko KPD subtipe molekular luminal.²⁰⁵ Adanya perbedaan etnik dan usia menyebabkan adanya perbedaan ekspresi dari subtipe molekular.²⁰⁶

Pada studi ini tidak ditemukan adanya hubungan antara ER, PgR, HER-3, K-67, dan subtipe molekular KPD dengan kadar Z-END. Saat ini peneliti belum

menemukan hubungan antara afinitas ER, PgR, HER-2, dan Ki-67 terhadap kadar Z-END yang dapat mempengaruhi kadar Z-END plasma.

5.6.8 Serum Glutamic Pyruvic Transaminase

Hasil studi ini menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara kadar SGPT dan kadar Z-END. Gangguan fungsi hati ditandai salah satunya dengan peningkatan enzim hati dapat memengaruhi metabolisme obat yang diperantarai oleh enzim sitokrom P-450. McConn *et al.*²⁰⁷ dan Yang *et al.*²⁰⁸ menunjukkan berkurangnya ekspresi protein sitokrom P-450 dan aktivitas katalitiknya dalam memetabolisme obat secara bermakna terjadi pada pasien sirosis hepatitis. Dalam kaitannya dengan TAM adanya gangguan fungsi hati dikhawatirkan dapat mengganggu konversi TAM menjadi Z-END sehingga dapat mengurangi kadar Z-END dalam darah.

Toksisitas pada hepar akibat pemberian TAM ditandai dengan peningkatan enzim hati. Moreira *et al.*²⁰⁹ menunjukkan pada tikus betina yang dilakukan pengangkatan ovarium pemberian TAM secara bermakna meningkatkan enzim alkali fosfatase (ALP) dan aspartat aminotransferase (AST) dibandingkan kelompok kontrol. Carthew *et al.*²¹⁰ menunjukkan pada hewan coba yang diberikan makanan mengandung TAM selama 3 bulan terjadi kerusakan DNA hati yang akan berkembang menjadi karsinoma hepatoselular. White *et al.*²¹¹ menunjukkan efek kerusakan DNA hati akibat pemberian TAM dapat terjadi pada waktu yang singkat (4 hari) pada penggunaan dosis yang lebih tinggi (45 mg/kg/hari). Gao *et al.*²¹² menunjukkan pemberian TAM pada dosis yang relatif rendah pada mencit (25 mg/kg/hari) dengan dosis yang equivalent dengan TAM 20 mg/hari (0,33 mg/kg/hari) pada manusia dapat meningkatkan kadar AST dan ALT serum. Peningkatan kadar AST dan ALT serum akibat pemberian TAM terjadi akibat kebocoran enzim dari hepatosit yang rusak disertai dengan perubahan mikroskopik dan makroskopik pada hati sudah dimulai bahkan pada awal terapi ($\pm$ 2 minggu).

TAM mengalami akumulasi di dalam mitokondria.²¹³ Efek hepatotoksistas TAM disebabkan oleh kemampuan obat ini menimbulkan terjadinya disfungsi mitokondria.^{214,215} Kadar metabolit END di dalam jaringan hepar bervariasi, namun relatif lebih tinggi dibandingkan TAM. Dalam kaitannya dengan disfungsi mitokondria, END pada rentang kadar yang tercapai di jaringan tidak memengaruhi

fungsi mitokondria pada hati tikus, sementara pada konsentrasi yang sama TAM dapat menginduksi lebih banyak kebocoran proton yang berkaitan dengan kerusakan membran mitokondria.²¹⁶

TAM dapat menimbulkan hepatotoksisitas (kerusakan mitokondria hepar) yang menyebabkan berkurangnya fungsi metabolisme enzim sitokrom P-450 sehingga membawa dampak berkurangnya konversi TAM menjadi END tidak terjadi pada semua individu. Faktor genetik, metabolik, dan lingkungan tampaknya juga dapat memberikan kontribusi dalam timbulnya disfungsi mitokondria sampai manifestasi hepar maupun ekstrahepatik (miopati, neuropati perifer, asidosis laktat, dan lainnya) dapat muncul.²¹⁴

Pada studi ini ada 26 subjek (20,8%) dengan nilai SGPT di atas *cut-off* (> 31 U/L), pada 2 subjek dieliminasi karena fungsi hatinya di atas 2,5 kali batas atas normal yaitu SN.31 dan SN.63. Pada kedua subjek ini Z-END (genotip/fenotip) adalah 2,09 ng/mL dengan (T/T/PM) dan 6,1 ng/mL (C/T/non-PM). Berdasarkan hasil studi ini tampaknya fenotip subjek dan kemampuan hati dalam memetabolisme TAM tidak mengalami gangguan walaupun terjadi peningkatan SGPT $\geq 2,5$ kali lipat. Hasil penelitian ini konsisten dengan Larrey *et al.*²¹⁷ yang melakukan studi bertujuan melihat efek penyakit hati terhadap kapasitas oksidasi dan fenotip seseorang. Hasil studi tersebut menunjukkan kapasitas oksidasi DMP terganggu pada pasien dengan sirosis hepatitis dan sedikit terganggu pada subjek non-sirosis, namun gangguan fungsi hati ini tidak merubah penentuan fenotip seseorang.²¹⁷

5.6.9 Rasio Serum Glutamic Pyruvic Transaminase/Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase dan Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Hasil studi ini menunjukkan sebanyak 24,8% subjek studi mempunyai rasio SGPT/SGOT yang tinggi. Rasio SGPT/SGOT yang ≥ 1 (tinggi) digunakan sebagai indikator untuk kemungkinan adanya *nonalcoholic-fatty liver disease* (NAFLD). Penggunaan TAM merupakan faktor risiko terjadinya NAFLD.²¹⁸ Penegakan diagnosis NAFLD selain melalui identifikasi faktor risiko, eksklusi penyakit lainnya, rasio SGPT/SGPT, dan melalui *hepatic imaging* menggunakan *ultrasonografi/magnetic resonance imaging*.²¹⁸ Ratio SGPT/SGOT atau AST/ALT (kadar serum SGPT lebih besar dari SGOT) merupakan salah satu prediktor

independen keberadaan NAFLD.²¹⁹ Diperkirakan ada hubungan antara rasio SGPT/SGOT dengan kadar Z-END plasma.

Pada hepar, ER α merupakan isoform ER yang paling banyak diekspresikan, sementara ER β diekspresikan dalam jumlah sedikit.²²⁰ Estrogen melalui ER α mempunyai peran di dalam regulasi trigliserid baik di hepar maupun jaringan adiposa.²²¹

Studi yang dilakukan oleh Pan *et al.*¹⁰⁷ di Taiwan menunjukkan terapi TAM dihubungkan dengan meningkatnya risiko timbulnya *fatty liver* yang baru sebesar 3,9 kali dan memperburuk *fatty liver* yang sudah ada sebesar 2,1 kali. Studi yang dilakukan oleh Yang *et al.*²²² di Korea menunjukkan terapi TAM dihubungkan dengan risiko meningkatnya ALT 2,2 kali, timbulnya *fatty liver* 3,6 kali.²²² Studi yang dilakukan oleh Liu *et al.*²²³ di Taiwan menunjukkan *fatty liver* dapat muncul dalam 3 bulan setelah terapi TAM dan bertahan 4 tahun setelah penghentian TAM.²²³ Studi-studi di atas mensupport ada hubungan bermakna antara terapi TAM dan timbulnya *fatty liver* pada subjek Asia.

Nonalcoholic fatty liver disease ditandai dengan akumulasi lemak pada hepatosit yang dimulai dengan steatosis dan berkembang menjadi *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) dan dapat berlanjut dengan fibrosis hepar progresif. NASH ditemukan pada 2,2% penderita KPD yang diterapi TAM.²²⁴

Studi yang dilakukan oleh Zhao *et al.*²²⁵ menunjukkan hepatosit yang diberikan perlakuan dengan TAM terjadi steatosis hepatik dan peningkatan sintesis asam lemak pada hepatosit melalui upregulasi sintesis *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c), yaitu faktor transkripsi yang mempromosi ekspresi gen lipogenik seperti *fatty acid synthase* (FAS), *acetyl-CoA* (ACC), dan *stearoyl-CoA desaturase* (SCD).

Lee *et al.*²²⁶ melakukan analisis gen pada hati tikus menunjukkan mekanisme molekular TAM dapat menginduksi steatosis hepatik adalah dengan merepresi 5 α -dihidrotestosteron maka TAM akan menginduksi aktivasi reseptor androgen dan fungsi transaktivasi intrinsik *retinoid acid receptor-related orphan receptor α -1* (ROR α 1), *hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF4 α), dan *nuclear receptor subfamily 2 group F member 1* (NF2F1); reseptor nucleus yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat dan lemak.

Larosche *et al.*²¹³ menunjukkan pada studi *in vitro* menggunakan hepar tikus TAM dapat mengurangi sekresi trigliserid oleh hepar dengan cara terakumulasi di mitokondria dan mengganggu β -oksidasi dan respirasi, selain itu TAM juga menghambat topoisomerase dan sintesis DNA mitokondria kemudian secara progresif mengurangi DNA mitokondria hepar *in vivo*. Berbeda dengan studi di atas, Miyashita *et al.*²²⁷ menunjukkan TAM mempunyai kemampuan mengurangi akumulasi lemak dan inflamasi di hati, sehingga TAM menunjukkan efek hepatoprotektif terhadap steatosis dan *non-alcoholic steatohepatitis* pada hewan coba melalui mekanisme peningkatan fosforilasi *extracellular signal-regulated kinase* yang erat kaitannya dengan proliferasi dan regenerasi sel hati.

Liu *et al.*²²⁸ menunjukkan penderita KPD yang diberikan terapi TAM 10 mg 2 kali sehari, kadar trigliserid serum meningkat bermakna (di atas 400 mg/dL) pada 14 subjek pasca 15 bulan terapi, dan saat dosis TAM diturunkan menjadi 10 mg/hari kadar trigliserid turun ke kadar aman pada 10 subjek dari 14 subjek.²²⁸ Studi tersebut menunjukkan penggunaan TAM dapat memicu peningkatan trigliserida dan penurunan dosis TAM menjadi 10 mg/hari dapat mengurangi peningkatan kadar trigliserida pada beberapa penderita KPD.

*The Italian Tamoxifen Chemoprevention Trial*²²⁹ menunjukkan penggunaan TAM meningkatkan risiko timbulnya *non-alkoholic steatohepatitis*, dan faktor-faktor yang dikaitkan sebagai prediktor timbulnya kelainan tersebut adalah subjek dengan *overweight*, obesitas, hiperkolesterolemi, dan hipertensi.

Telepas dari apakah TAM dapat menyebabkan terjadinya NAFLD, perlu dicatat bahwa hasil studi ini menunjukkan sebagian besar subjek studi mempunyai berat badan lebih/obesitas, dan ada yang menderita diabetes melitus yang merupakan faktor risiko NAFLD. Selain itu tidak dilakukan pemeriksaan hepar dengan USG/MRI sebelum pemberian TAM sehingga kita tidak tahu pasti apakah NAFLD terjadi pada studi ini akibat pemberian TAM atau tidak. Penggunaan SGPT untuk *screening* adanya NAFLD mempunyai limitasi antara lain adanya perbedaan batas atas normal dari SGPT dari tiap laboratorium, selain itu tingginya kadar SGPT tidak selalu sejalan/sesuai dengan beratnya kelainan histologi dari NAFLD.²³⁰

Studi yang dilakukan oleh Ahmad *et al.*²³¹ menunjukkan pemberian END dosis multipel harian 2–4 mg/hari akan memberikan pajanan END sama dengan yang ditemukan pada penderita KPD yang diberikan terapi TAM 20 mg/hari dengan fungsi CYP2D6 normal. Pemberian END tidak menimbulkan adanya perubahan hematologi, biokimia dan kadar kolesterol maupun trigliserid. Studi yang dilakukan oleh peneliti di atas menggunakan END dosis tunggal yang dilakukan pada sukarelawan sehat sehingga belum diketahui pasti efeknya pada penderita KPD.

Belum diketahui dengan pasti apakah END merupakan alternatif yang lebih baik dari TAM bagi penderita KPD dalam kaitannya dengan polimorfisme genetik CYP2D6, disfungsi mitokondria maupun perubahan profil lipid akibat pemberian TAM.

5.6.10 Riwayat Kemoterapi

Pada studi ini sebanyak 75 subjek (60%) memperoleh kemoterapi sebelumnya, namun tidak ditemukan adanya hubungan antara riwayat penggunaan kemoterapi sebelumnya dengan kadar Z-END plasma ($p = 0,88$). Beberapa obat kemoterapeutik memerlukan peran sitokrom P-450 dalam aktivitasnya. Siklofosfamid bekerja menghambat proliferasi sel dengan mengganggu replikasi DNA memerlukan peran CYP2B6 dan CYP2C19 dalam aktivasinya.²³² Docetaxel memerlukan CYP3A4 untuk inaktivasinya, dan ekspresi kadar mRNA CYP3A4 pada tumor payudara dapat menjadi prediktor respons individual terhadap efektivitas obat tersebut.²³³

Ada kesamaan isoform CYP-P450 antara kedua obat kemoterapeutik di atas dengan TAM, sehingga potensial terjadi interaksi. Pada studi ini tidak ditemukan adanya hubungan antara riwayat penggunaan kemoterapi sebelumnya dengan kadar Z-END. Hal ini dapat disebabkan oleh karena pemberian kemoterapi dengan penggunaan TAM dilakukan dalam rentang waktu yang berbeda sehingga kemungkinan interaksi tidak mungkin terjadi, selain itu peneliti belum menemukan studi yang melihat efek kemoterapi dalam mengubah ekspresi isoform P-450 sehingga dapat mempengaruhi kadar Z-END.

5.6.11 *Adherence*

Hasil studi ini menunjukkan sebanyak 39 subjek (31,2%) mempunyai *adherence* tinggi. Subjek yang memiliki *adherence* tidak tinggi mempunyai risiko 3,2 kali lebih besar untuk memiliki kadar Z-END plasma di bawah 5,9 ng/mL dibandingkan subjek dengan *adherence* tinggi secara bermakna ($p = 0,004$).

Berdasarkan tinjauan sistematis dilaporkan prevalensi *adherence* (41–72%) dan penghentian terapi dalam 180 hari/*non-persistence* (31–73%) pada penggunaan terapi hormonal yang diukur pada akhir tahun kelima.¹⁰⁹ Studi yang dilakukan oleh Lash *et al.*¹¹⁰ menunjukkan penghentian terapi TAM lebih sering pada tahun pertama dan hanya $\pm 50\%$ yang menyelesaikan terapi pada tahun kelima.

Hershman *et al.*²⁰ menunjukkan adanya hubungan antara *non-adherence* dan penghentian terapi hormonal dini dengan peningkatan mortalitas pada perempuan penderita KPD dari negara Eropa. Studi yang dilakukan oleh Hsieh *et al.*²³⁴ pada penderita KPD dari negara Asia ternyata menunjukkan hasil yang sama. Subjek yang menghentikan terapi dini dan *non-adherence* masing-masing mempunyai risiko masing-masing sebesar 1,32 kali dan 1,45 kali lebih besar mengalami peningkatan kejadian mortalitas secara bermakna.

Kepustakaan menunjukkan efek TAM dalam menekan pertumbuhan tumor diperantarai oleh END bersifat *concentration dependent*, dalam arti diperlukan rentang kadar tertentu di dalam darah agar obat dapat berkerja maksimal dan menekan rekurensi KPD. Hal ini mungkin dapat menjadi salah satu penjelasan hubungan antara *non-adherence* dan penghentian terapi TAM dini dengan peningkatan mortalitas pada penderita KPD. Kedua studi ini melihat mortalitas secara umum dan tidak spesifik mortalitas akibat KPD.

Penilaian *adherence* pada studi ini menggunakan *Morisky medication adherence scale-8* (MMAS-8) yang hanya fokus terhadap kebiasaan subjek studi dalam mengonsumsi TAM, terutama yang berkaitan dengan *underuse* seperti lupa minum obat, dan kemudian mengidentifikasi derajat *adherence* dari subjek studi. Studi ini tidak mencari penyebab lain dari *non-adherence* dari subjek studi.

Berdasarkan kepustakaan ada banyak sebab *non-adherence*. Tinjauan sistematis menunjukkan ada hubungan negatif antara usia ekstrim (lebih tua atau lebih muda),

obat yang dibeli sendiri, *follow-up* ke dokter umum dari pada ke onkologis, tingginya aktivitas CYP2D6, pergantian terapi dari satu ke terapi lainnya, dan efek samping dengan *adherence*/penghentian terapi dini.¹⁰⁹ Studi yang dilakukan oleh Cluze *et al.*²³⁵ dan Gao *et al.*²³⁶ menunjukkan penderita KPD yang diberikan kesempatan untuk menanyakan risiko dan manfaat terapi yang diberikan pada saat diagnosis lebih jarang untuk menghentikan TAM. Tampaknya komunikasi efektif antara tenaga kesehatan dengan penderita KPD juga memberikan kontribusi dalam *adherence*.

5.7 Analisis Multivariat

Hasil analisis regresi logistik ganda menunjukkan ada hubungan bermakna secara statistic antara fenotip dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma ($p < 0,001$). Genotip tidak berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END plasma ($p = 0,05$), namun dimasukkan dalam pemodelan akhir karena secara substansi mempunyai kontribusi yang besar di dalam penentuan fenotip subjek studi. *R square* genotip dan fenotip adalah sebesar 55,2% yang artinya kedua variabel ini memberikan kontribusi sebesar 55,2% dalam pencapaian kadar Z-END dalam plasma. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis awal dari studi ini.

Saat ini belum banyak studi yang membandingkan peranan genotip dan fenotip CYP2D6 terhadap metabolisme TAM menjadi Z-END. Antune *et al.*²⁷ menunjukkan genotip dan fenotip masing-masing berkontribusi sebesar 12% dan 26% terhadap variabilitas kadar END. Tujuan dan analisis statistik yang berbeda menyebabkan kita hanya bisa melihat bahwa konsisten dengan hasil studi ini fenotip lebih besar peranannya dalam hubungannya dengan pencapaian kadar Z-END.

Pada studi ini terbukti bahwa fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END, maka berdasarkan hasil studi ini fenotip bisa digunakan sebelum memulai terapi dan mudah untuk diaplikasikan pada penderita KPD di Indonesia.

5.8 Obat-Obat yang Dikonsumsi Bersama Tamoksifen

Hasil studi ini menunjukkan sebanyak 18/65 subjek diberikan suplemen kalsium-vitamin D3. Pemberian suplemen ini oleh dokter ketika ditanyakan pada subjek

studi karena berkaitan dengan keluhan nyeri dan kaku pada sistem muskuloskeletal yang dialami subjek studi.

Saat ini sudah ada beberapa studi yang dilakukan untuk melihat hubungan antara waktu minum obat dan kadar END. Teft *et al.*²³ menunjukkan kadar END 20% lebih rendah pada musim dingin dibandingkan dengan lebih rendahnya pajanan sinar matahari dan kadar vitamin D. Pasien yang mengonsumsi suplemen vitamin D cenderung mempunyai kadar END lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak melakukannya.²³ Antunes *et al.*²⁸ menunjukkan kadar Z-END lebih tinggi 24% pada musim panas dibandingkan dengan musim dingin, namun efek sinar matahari yang mengandung vitamin D menginduksi aktivitas metabolik CYP3A4 tidak berhasil dikonfirmasi oleh studi tersebut. Studi yang dilakukan oleh Teft *et al.*²³ dan Antunes *et al.*²⁸ menunjukkan kadar Z-END akan lebih tinggi bila sampel darah yang diambil saat musim panas atau semi dibandingkan musim dingin. Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh studi Marcath *et al.*²³⁷ yang menunjukkan kadar END akan lebih tinggi pada musim dingin. Alasan adanya perbedaan ini tidak jelas, tetapi dapat disebabkan oleh perbedaan pajanan sinar matahari tergantung geografis, suplementasi vitamin D, meningkatnya *adherence* selama musim dingin karena meningkatnya toleransi terhadap *hot flashes*. Studi yang dilakukan oleh Thummel *et al.*²³⁸ dan Thirumaran *et al.*²³⁹ menunjukkan interaksi 1,25-vitamin D3 dan vitamin D receptor (VDR) dapat menginduksi ekspresi CYP3A4 intestinal. Terikatnya VDR-*retinoid X receptor* (RXR) heterodimer dengan CYP3A RXR *response element* akan menginduksi transkripsi gen yang akan meningkatkan ekspresi CYP3A4 intestinal.^{238 239}

Indonesia adalah negara tropis yang berarti pajanan sinar matahari yang mengandung vitamin D selalu tersedia sepanjang tahun sehingga diduga tidak akan ditemukan defisiensi vitamin D dibandingkan negara Eropa yang terdiri dari 4 musim. Studi yang dilakukan oleh Setiati *et al.*²⁴⁰ dan Green *et al.*²⁴¹ menunjukkan walaupun Indonesia mempunyai pajanan sinar matahari yang cukup. Sebanyak 35–63% perempuan Indonesia mempunyai kadar vitamin D suboptimal. Pada studi ini kadar vitamin D subjek studi tidak diperiksa sehingga tidak dapat dihubungkan dengan kadar Z-END dalam plasma, namun perlu diingat selain lamanya pajanan dengan sinar matahari, asupan vitamin D dari makanan maupun suplemen vitamin

D, penggunaan pakaian tertutup maupun tabir surya juga dapat memengaruhi kadar vitamin D dalam darah dan mungkin ada korelasinya dengan kadar Z-END dalam plasma.²⁴²

5.9 Interaksi Obat

Metabolisme TAM menjadi metabolit aktif Z-END bersifat kompleks. CYP2D6 merupakan enzim primer yang berperan dalam pembentukan Z-END, namun efikasi TAM juga dipengaruhi oleh isoform CYP lain (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, dan CYP3A4), transporter P-glikoprotein (ABCB1, ABCC2), enzim metabolisme fase II (glukuronidase),²⁴³⁻²⁴⁵ Aktivitas enzim dan transporter ini tidak hanya dipengaruhi oleh polimorfisme genetik (genotip) tapi juga obat lain yang diberikan bersama dengan TAM.

5.9.1 Rifampisin

Hasil studi ini menunjukkan ada satu subjek (SN.79) yang mendapatkan obat antituberkulosis yang mengandung rifampisin. Pada subjek ini genotipnya adalah C/T dan kadar Z-END plasmanya sebesar 1,25 ng/mL.

TAM dan Z-END merupakan substrat untuk enzim dan transporter yang peka terhadap induksi rifampisin. Sebuah laporan kasus menunjukkan berkurangnya kadar Z-END plasma pada perempuan yang diterapi rifampisin (600 mg/hari) selama 10 hari. Kadar Z-END *baseline* sebelum diterapi rifampisin masih dalam rentang terapeutik (46 nM atau $\pm 17,4$ ng/mL), namun 2 minggu setelah penggunaan rifampisin 10 hari kadar Z-END berkurang menjadi subterapeutik (15,75 nM atau 5,9 ng/mL). Sepuluh minggu setelah rifampisin dihentikan, kadar END meningkat menjadi 2 kali lipat.²⁴⁶

Studi prospektif yang dilakukan oleh Binkhorst *et al.*²⁵ yang bertujuan melihat adanya kemungkinan pengaruh induksi enzim terhadap TAM pada pasien KPD yang menggunakan TAM bersama dengan rifampisin 600 mg/hari selama 10–15 hari per oral. Hasil studi tersebut menunjukkan rifampisin dapat mengurangi kadar TAM 6,2 kali lipat, dan analisis interim pada 4 pasien menunjukkan berkurangnya AUC END hingga sebanyak 70% setelah pemberian rifampisin.²⁵

Studi yang dilakukan oleh Scheer *et al.*²⁴⁷ pada hewan coba menunjukkan CYP3A4 dan CYP2D6 keduanya diekspresikan di hati dan intestinal, dan terapi dengan rifampin selama 3 hari meningkatkan ekspresi protein CYP3A4 pada kedua jaringan tetapi tidak terjadi pada CYP2D6. Hasil di atas didukung oleh kepustakaan yang menyatakan tidak seperti CYP1, CYP3, dan anggota CYP2 lainnya, CYP2D6 resisten terhadap induksi rifampisin dan obat lain yang bersifat menginduksi.²⁴⁸

Selain berikatan dengan ER, END juga berikatan dengan ABCB1 dan merupakan substrat dari transporter ABCB1 (P-glikoprotein) yang terlibat dalam resistensi banyak obat termasuk TAM.²⁴⁹ Studi yang dilakukan oleh Teft *et al.*²⁴⁹ menunjukkan pada pasien dengan aktivitas ABCB1 yang tinggi meningkatnya rekurensi dan metastasis pasien KPD akibat lebih tingginya efluks END dari sel kanker sehingga akan mengurangi efikasi TAM. Studi yang dilakukan oleh Teh *et al.*²⁵⁰ menunjukkan pada subjek dengan aktivitas CYP2D6 yang berkurang (IM) disertai dengan aktivitas ABCB1 yang tinggi, median waktu yang dibutuhkan untuk timbulnya rekurensi dan metastasis lebih singkat dibandingkan subjek dengan CYP2D6 IM atau aktivitas ABCB1 yang lebih tinggi saja (12 bulan vs. 48 bulan).

Selain ABCB1, studi menunjukkan pada pasien KPD yang memperoleh terapi TAM dengan aktivitas ABCC2 tinggi juga dihubungkan dengan rekurensi KPD¹⁵⁷ dan meningkatnya risiko metastasis jauh²⁵¹ dibandingkan alel varian dengan aktivitas yang berkurang. Selain itu pada subjek dengan kombinasi genotip aktivitas ABCC2 (ABCC2 CC) dan aktivitas ABCB1 (ABCB1 CT + TT) yang lebih tinggi dihubungkan dengan berkurangnya *disease-free survival* dibandingkan kombinasi genotip ABCC2 dan ABCB1 lainnya.²⁵¹

Kemampuan rifampisin dalam mengurangi kadar END dalam plasma terjadi melalui beberapa cara antara lain: mengurangi bioavailabilitas TAM (melalui induksi ABCB1), meningkatkan metabolisme TAM melalui induksi CYP-P450 atau enzim glukuroniltrasferase (UGT). Selain itu tampaknya END juga mengalami konjugasi dengan glukuronid via enzim UGT, sehingga ada kemungkinan rifampisin dapat meningkatkan metabolisme fase II yang akan mengakibatkan berkurangnya kadar END.²⁵²

5.9.2 Sertralin

Pembentukan END terutama melalui CYP2D6. Penggunaan TAM bersama dengan *selective serotonin receptor inhibitor* (SSRI) yang merupakan inhibitor CYP2D6 dapat mengakibatkan penghambat metabolisme TAM dan mengurangi pembentukan END dalam plasma.^{16 15, 149} Hasil studi ini menunjukkan ada satu subjek (SN.24) yang mendapatkan obat antidepresi sertralin 50 mg sekali sehari. Pada subjek ini genotipnya adalah T/T dan kadar Z-END plasmanya sebesar 3,05 ng/mL.

Ada perbedaan potensi dalam penghambatan aktivitas enzim CYP2D6 dari SSRI, yang menimbulkan hambatan paling kuat (paroksetin, fluoksetin), sementara yang lemah (sitalopram, escitalopram, sertralin, fluoksetin). Sertralin merupakan *selective serotonin receptor inhibitor* yang dipakai untuk mengatasi depresi. Besarnya dosis obat yang diberikan menentukan efek obat ini sebagai inhibitor CYP2D6 lemah atau kuat. Pada dosis 50 mg/hari sertralin merupakan inhibitor lemah CYP2D6, tetapi bila dosis ditingkatkan hingga 200 mg/hari maka obat ini mempunyai efek sebagai inhibitor poten CYP2D6.²⁵³

Studi yang dilakukan oleh Jin *et al.*¹⁶ menunjukkan pada penderita KPD dengan genotip *wt/wt* yang mengkonsumsi TAM 20 mg/hari, bersama dengan SSRI (paroksetin dan fluoksetin) yang merupakan inhibitor poten CYP2D6 dapat mengurangi kadar END hingga 58% dibandingkan dengan subjek yang tidak mengonsumsi. Pada genotip *wt/v* penggunaan TAM bersama inhibitor lemah CYP2D6 dapat mengurangi kadar END 38% lebih rendah dibandingkan subjek yang tidak mengonsumsi.¹⁶

Studi yang dilakukan oleh Borges *et al.*¹⁴⁹ pada penderita KPD penggunaan TAM dengan inhibitor lemah CYP2D6 seperti halnya sertralin dapat menurunkan kadar END 24% lebih rendah dibandingkan dengan subjek yang tidak menggunakan inhibitor CYP2D6, sementara pada subjek yang menggunakan inhibitor poten CYP2D6 (paroksetin) kadar END 72% lebih rendah.¹⁴⁹

Binkhorst *et al.*²⁵⁴ melakukan *switching* antidepresan penghambat kuat CYP2D6 (paroksetin, fluoksetin) dengan penghambat lemah CYP2D6 (escitalopram atau venlafaksin) menunjukkan kadar END meningkat 3 kali lebih tinggi dibandingkan

kadar pada penggunaan penghambat kuat CYP2D6 (387 [159–637] vs. 99.2 [70.0–210] nM_h; $p = 0.012$).²⁵⁴ Penggantian obat antidepresan tidak menimbulkan problem psikiatrik atau efek samping yang berhubungan dengan penggunaan obat antidepresan.²⁵⁴

Hingga saat ini masih menjadi kontradiksi apakah penggunaan SSRI akan memengaruhi efikasi TAM. Metaanalisis yang dilakukan oleh Cronin-Fenton *et al.*²⁵⁵ pada 8 studi untuk melihat hubungan antara inhibitor CYP2D6 lemah dan rekurensi/survival pada perempuan yang menggunakan TAM. Hasil metaanalisis tersebut menunjukkan tidak terlihat ada perbedaan bermakna terjadinya peningkatan risiko rekurensi KPD pada perempuan yang menggunakan inhibitor lemah CYP2D6 bersama dengan TAM (*effect estimate* = 1,05; IK95% 0,91–1,22).

Studi kohort yang dilakukan oleh Busby *et al.*²⁵⁶ menunjukkan penggunaan SSRI jangka panjang dihubungkan dengan meningkatnya mortalitas KPD sebesar 27%. Studi kohort lainnya yang dilakukan Chubak *et al.*²⁵⁷ menunjukkan adanya peningkatan risiko rekurensi KPD perempuan yang menggunakan paroksetin bersama dengan TAM sebesar 1,49 kali, namun tidak bermakna secara statistik (*adjusted HR*: 1,49; IK95%: 0,79–2,83). Studi kohort yang dilakukan oleh Haque *et al.*²⁵⁸ meneliti hubungan penggunaan inhibitor kuat dan lemah CYP2D6 dengan risiko KPD baru (rekurensi, metastasis, atau kolateral KPD) menunjukkan sangat sedikit *evidence* terjadinya peningkatan KPD baru.

Studi *nested case control* yang dilakukan oleh Valachis *et al.*²⁵⁹ menunjukkan tidak ada risiko lebih pada *breast cancer specific mortality* yang dihubungkan dengan penggunaan SSRI dengan TAM. Studi kohort yang dilakukan Denneyong *et al.*²⁶⁰ mengklasifikasikan SSRI berdasarkan kemampuannya dalam menghambat CYP2D6 yaitu pasien yang menggunakan penghambat kuat CYP2D6 (paroksetin, fluoksetin), dan pasien yang menggunakan penghambat sedang–lemah CYP2D6 (sitalopram, escitalopram, fluoksetin, dan sertralin) bersama dengan TAM juga tidak menemukan adanya hubungan di antara penggunaan SSRI dengan meningkatnya mortalitas, namun pada analisis stratifikasi ditemukan lebih tingginya risiko mortalitas pada perempuan di bawah 50 tahun yang menggunakan penghambat kuat SSRI.

Pada studi ini ada banyak obat yang digunakan oleh subjek studi yang dimetabolisme oleh enzim isoform CY450 yang juga memetabolisme TAM sehingga potensial terjadi interaksi, namun sebagian besar *evidence* lebih menunjukkan adanya interaksi TAM bersama dengan SSRI atau rifampisin.

*The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy*¹⁶⁵ saat ini merekomendasikan untuk menghindari penggunaan TAM bersama dengan penghambat sedang dan kuat CYP2D6 pada pasien yang diterapi TAM. Pada IM CYP2D6 penghambat lemah CYP2D6 juga dikontraindikasikan.¹⁶⁵

5.9.3 Masalah Studi Interaksi Obat

Permasalahan sulitnya menilai studi interaksi obat adalah: (a). *Outcome* dari interaksi TAM dengan obat lainnya tidak dapat dinilai dalam waktu dekat karena untuk timbulnya *cancer-specific-endpoint* seperti rekurensi KPD butuh waktu bertahun-tahun, (b). Informasi mengenai *adherence* tidak tercatat dengan baik, (c). Walaupun obat-obat yang diberikan bersamaan dengan TAM dimetabolisme oleh enzim CYP-P450 yang sama, namun tidak semua interaksi obat itu memberikan efek yang bermakna secara klinis.^{252, 261}

Dalam kaitannya dengan TAM, persoalan interaksi obat ini semakin kompleks karena metabolismenya yang melibatkan banyak isoform CYP-P450. Studi yang dilakukan Cotreau *et al.*²⁶² pada hewan coba memperlihatkan TAM dapat menginduksi isoform CYP3A dan CYP2B. Studi *in-vitro* yang dilakukan oleh Zhao *et al.*²⁶³ menunjukkan TAM dan metabolitnya (N-desmetil-TAM, 4-hidroksi-TAM, dan 3-hidroksi-TAM) dapat menghambat isoform CYP3A4/5. Berdasarkan data ini maka TAM dan metabolitnya dapat berfungsi sebagai penginduksi maupun penghambat isoform P450 yang dapat memengaruhi metabolisme maupun obat lain yang merupakan substrat isoform P450 (khususnya CYP3A dan CYP2B) pada pemberian bersama TAM. Semua kondisi ini semakin mempersulit untuk menilai apakah interaksi TAM dengan obat lain bermakna atau tidak secara klinik.

5.10 Adverse Event

Penggunaan TAM jangka panjang dapat menyebabkan bermacam-macam AE antara lain: *hot flashes*, perubahan ginekologi (vagina kering, dan *vaginal*

discharge), depresi, instabilitas *mood*, peningkatan berat badan.¹⁰¹ Selain itu ada laporan AE yang cukup serius berupa hiperplasia endometrial/keganasan endometrial, *venous thromboembolic disease*, dan kerusakan hati atau karsinoma hepatoselular⁹¹ pernah dilaporkan

5.10.1 *Hot flashes*

Hasil studi ini menunjukkan *hot flashes* merupakan ADR yang paling banyak dialami oleh subjek studi yang mengkonsumsi TAM ditemukan pada 38 subek (30,4%). Prevalensi *hot flashes* pada studi ini lebih rendah dari studi yang dilakukan oleh Lorizio *et al.*¹⁰¹ dan Bexter *et al.*²⁶⁴ pada etnik Kaukasia yang melaporkan kejadian *hot flashes* masing-masing sebesar 64% dan 77% .

*The Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial*³⁷ menunjukkan sebanyak 37,5% subjek yang melaporkan efek samping *hot flashes* dalam 3 bulan pertama mempunyai risiko rekurensi lebih rendah secara bermakna dibandingkan subjek yang tidak melaporkan efek samping (HR = 0,84; IK95% 0,71–1,00; p = 0,04).

Mekanisme yang mendasari timbulnya *hot flashes* sampai saat ini masih belum diketahui.²⁶⁵ Hipotesis yang ada menyatakan timbulnya gejala *hot flashes* terjadi ketika ada fluktuasi kadar hormon estrogen (*estrogen withdrawal*) yang disebabkan oleh adanya disfungsi termoregulator di hipotalamus.²⁶⁵

Hipotesis yang masih kontroversial adalah pada subjek dengan kemampuan metabolisme yang baik (EM CYP2D6) akan lebih rentan mengalami *hot flashes* dan efek samping lainnya karena aktivitas metabolismenya lebih baik. Beberapa studi menunjukkan adanya hubungan bermakna antara genotip CYP2D6 dengan gejala *hot flashes*. Studi yang dilakukan oleh Henry *et al.*²⁶⁶ menunjukkan IM CYP2D6 lebih sering mengalami *hot flashes* secara bermakna dibandingkan EM dan PM. Subjek PM paling jarang mengalami efek tersebut. Studi yang dilakukan oleh Bonanni *et al.*²⁶⁷ menunjukkan subjek PM CYP2D6 juga mengalami *hot flashes*.²⁶⁷ Studi yang dilakukan oleh Jansen *et al.*²⁶⁸ menunjukkan beratnya *hot flashes* yang dialami subjek yang mengkonsumsi TAM tidak bisa diprediksi dari genotip CYP2D6 maupun kadar END.

Hasil studi ini menunjukkan tidak ada hubungan antara *hot flashes* dengan pencapaian kadar MTC Z-END ($p = 0,83$; IK 95% 0,43–1,99). Hingga saat ini masih bersifat kontradiksi apakah kadar END berhubungan dengan timbulnya *hot flashes* pada subjek yang mengkonsumsi TAM. Studi yang dilakukan oleh Lorzio *et al.*¹⁰¹ melihat apakah kadar END merupakan prediktor efek samping TAM menunjukkan hasil perempuan dengan kadar END lebih tinggi lebih sering melaporkan efek samping (OR = 1.67; IK95% 1.01–2.77 per simpangan baku peningkatan END). Irvin *et al.*¹⁰² menunjukkan tidak ditemukan adanya hubungan antara kadar END dengan *hot flashes* pada awal terapi maupun 4 bulan setelah peningkatan dosis. Jager *et al.*¹⁰³ menunjukkan *hot flashes* tidak dapat digunakan untuk memprediksi kadar TAM dan metabolitnya, namun ditemukan adanya hubungan bermakna antara IMT dengan frekuensi ($p = 0,04$) dan beratnya *hot flashes* ($p < 0,0001$), dan pasien dengan kadar estradiol yang rendah lebih sering mengalami *hot flashes* yang berat ($p = 0,02$).¹⁰³ Bexter *et al.*²⁶⁴ menunjukkan ada hubungan terbalik antara kadar END dengan *severity score hot flashes*, di mana kadar END lebih tinggi cenderung diprediksi mempunyai *severity score hot flashes* yang lebih rendah selama penggunaan TAM.²⁶⁴ Berdasarkan *evidence* yang ada saat ini masih bersifat kontradiksi apakah *hot flashes* pada penggunaan TAM dapat ditentukan berdasarkan genotip ataupun kadar END.

5.10.2 Sistem Muskuloskeletal

Di dalam tatalaksana KPD, penggunaan TAM menimbulkan beberapa laporan efek samping yang berkaitan dengan simptom menopause akibat berkurangnya hormon estrogen, salah satunya adalah efek pada sistem muskuloskeletal.²⁶⁹ Hasil studi ini menunjukkan keluhan pada sistem muskuloskeletal dilaporkan pada 24 subjek (19,2%), dan merupakan keluhan kedua terbanyak dari ADR yang dilaporkan.

Bila dibandingkan antara TAM dan inhibitor aromatase maka efek samping pada sistem muskuloskeletal akibat penggunaan TAM lebih rendah secara bermakna dibandingkan inhibitor arotamatase (12–41% vs. 23–64%).²⁷⁰ Metaanalisis dari *randomized controlled trials* membandingkan efikasi dan *safety* anastrozole (aromatase inhibitor) vs. TAM menunjukkan lebih tingginya insiden atralgia (1,55 kali) dan nyeri tulang (1,31 kali) dibandingkan TAM.²⁷¹

Hasil studi ini menunjukkan tidak ditemukan hubungan bermakna antara keluhan sistem muskuloskeletal dengan pencapaian MTC Z-END ($p = 0,11$; IK95% 0,22–1,17). Hingga saat ini masih belum jelas dan ada banyak hipotesis yang berkaitan dengan mekanisme TAM dalam menimbulkan keluhan muskuloskeletal/artromialgia. Salah satu penjelasannya adalah berkurangnya kadar estrogen pada sendi akibat pemberian TAM, mengingat ER α juga diekspresikan pada jaringan sinovial dan berperan dalam proses inflamasi pada sendi.²⁷²

Vitamin D mempunyai peran penting dalam hemostasis kalsium dan metabolisme tulang. Estrogen diketahui dapat meningkatkan aktivitas enzim 1-alfa-hidroksilase yang bertanggungjawab dalam konversi 25-hidroksi-vitamin-D (25-(OH)-vitD) menjadi bentuk aktifnya 1,25-di-hidroksi-vitamin D (1,25-(OH)-vit D) dan meningkatkan aktivitas reseptor vitamin D. Defisiensi vitamin D (vit D) menunjukkan gejala sindrom muskuloskeletal yang mirip dengan yang dialami oleh subjek yang mengonsumsi TAM berupa nyeri muskuloskeletal yang tidak spesifik dan bersifat menyeluruh, disertai kekakuan.²⁷³

Studi observasional yang dilakukan oleh Shi *et al.*²⁷⁴ pada perempuan KPD menunjukkan sebanyak 23% subjek mengalami defisiensi vitamin D (< 30 nmol/L) dan 48% subjek mengalami insufisiensi vitamin D (30–50 nmol/L). Hasil penelitian tersebut menunjukkan penderita KPD juga mempunyai kadar vitamin D yang rendah dibandingkan orang sehat. Studi yang dilakukan oleh Khan *et al.*²⁷⁵ dan Rastelli *et al.*²⁷⁶ menunjukkan ada korelasi antara rendahnya kadar 25-OH-vit D dengan tingginya probabilitas *aromatase inhibitor-related arthralgia*. Studi yang dilakukan Prieto-Alhambra *et al.*²⁷⁷ menunjukkan timbulnya artralgia akibat terapi inhibitor aromatase dapat dicegah bila kadar 25-OH-vit D dalam serum sebesar 40 ng/ml.

Studi yang dilakukan oleh Kim *et al.*²⁷⁸ pada perempuan pramenopause yang didiagnosis dengan KPD nonmetastasis menunjukkan pasien yang memperoleh terapi TAM memperlihatkan adanya peningkatan kadar 25-OH-vit D yang bermakna pada 6 dan 12 bulan. TAM tampaknya mempunyai efek antiestrogen dan agonis estrogen pada tulang. ER α yang juga diekspresikan di ginjal, ada kemungkinan efek agonis estrogen TAM dapat meningkatkan reabsorpsi kalsium

ginjal independen dari kadar hormon paratiroid dalam tubuh.²⁷⁹ Mekanisme lainnya adalah TAM dapat meningkatkan jumlah reseptor vitamin D pada jaringan KPD, di mana efek ini bersifat *dose dependent*.²⁸⁰

Ada studi yang melihat hubungan END dan efeknya terhadap tulang. Gingery *et al.*²⁸¹ melakukan pengangkatan ovarium pada hewan coba memperlihatkan END memiliki efek yang mirip dengan TAM yaitu meningkatkan massa tulang kalkaneus dan kortikal. Efek tersebut menguntungkan pada perempuan KPD pascamenopause. Studi yang dilakukan oleh Gingery *et al.*²⁸² pada hewan coba menunjukkan END tidak menginduksi terjadinya hilangnya massa tulang pada hewan coba dengan ovarium yang intak dan memperlihatkan efek agonis parsial pada tulang pada hewan coba yang dilakukan pengangkatan ovarium. Berdasarkan studi hewan coba ini masih belum jelas apakah efek END akan berbeda dengan TAM.

Berdasarkan *evidence* yang ada, masih belum diketahui pasti apakah keluhan pada sistem muskuloskeletal yang dialami oleh subjek studi terjadi akibat perjalanan penyakit kanker, atau karena defisiensi vitamin D. Berkaitan dengan ini *the Endocrine Society of Australia, the Australian and New Zealand Bone & Mineral Society, the Australia Menopause Society and the Clinical Oncology Society of Australia*²⁸³ saat ini merekomendasikan untuk melakukan penilaian dan manajemen kesehatan tulang secara rutin salah satunya dengan memberikan kalsium dan vitamin D pada perempuan dengan ER positif yang menerima terapi endokrin baik yang memperoleh terapi adjuvan maupun TAM dengan target 25-OH-vit D sebesar 75 nmol/L (35 ng/mL) dalam serum.

5.10.3 Hiperplasia Endometrial

Hasil studi ini menunjukkan hiperplasia endometrial ditemukan pada 6 subjek (4,8%). TAM merupakan *selective estrogen receptor modulator* yang dapat berfungsi sebagai agonis atau antagonis terhadap ER bersifat spesifik terhadap jaringan.²⁸⁴ Pada jaringan payudara TAM bekerja sebagai antagonis ER- α , sementara pada endometrium TAM menimbulkan efek sebagai agonis estrogen (agonis ER- β) sehingga dapat menyebabkan meningkatnya abnormalitas

endometrium seperti hiperplasia, hingga keganasan.²⁸⁵ Adanya perbedaan efek TAM terhadap uterus ini disebabkan karena protein regulator *steroid receptor coactivator 1* (SRC1) diekspresikan dalam jumlah tinggi di uterus, namun hanya sedikit diekspresikan di sel KPD.⁵²

Hasil studi ini menunjukkan tidak ditemukan hubungan bermakna antara hiperplasia endometrial dan pencapaian MTC Z-END ($p = 0,68$; IK95% 0,32–10,42). Studi hewan coba menunjukkan efek uterotropik TAM sebanding dengan dosis TAM.^{286, 282} Efek TAM terhadap uterus tergantung dari dosis dan lama pemberian TAM (*dose- and duration- dependent*).²⁸⁷ Ada studi dan metaanalisis menunjukkan efek uterotropik TAM tidak ada hubungannya dengan dosis harian TAM, tetapi dengan lama, dan akumulasi pemakaian.^{106, 288, 289} Studi yang dilakukan Bergman *et al.*¹⁰⁶ menunjukkan risiko kanker endometrial meningkat dengan semakin lamanya penggunaan TAM secara bermakna yaitu sebesar 2 kali pada penggunaan 2–5 tahun, dan 6,9 kali pada penggunaan paling sedikit 5 tahun dibandingkan subjek yang tidak menggunakan TAM.¹⁰⁶ Metaanalisis dan tinjauan sistematis yang dilakukan oleh Fleming *et al.*²⁸⁹ menunjukkan risiko kumulatif keganasan endometrial meningkat 2 kali lipat yaitu dari 1,5 menjadi 3,2% dengan perpanjangan terapi dibandingkan terapi standar selama 5 tahun penggunaan TAM.

Status menopause tampaknya berperan dalam menentukan risiko mengalami efek uterotropik TAM. Swerdlow *et al.*²⁸⁸ menunjukkan perempuan pra dan pascamenopause mempunyai risiko yang sama untuk mengalami efek samping keganasan endometrial, namun Davies *et al.*²⁹⁰ yang membandingkan penggunaan jangka panjang tamoksifen 10 tahun vs. 5 tahun dalam ATAC *trial* menunjukkan perempuan pramenopause mempunyai risiko lebih rendah mengalami keganasan endometrial dibandingkan perempuan pascamenopause. Vosse *et al.*²⁹¹ menunjukkan perempuan pascamenopause mempunyai risiko tinggi mengalami keganasan endometrial adalah yang mempunyai abnormalitas endometrium (polip merupakan kelainan patologi yang pertama kali dan paling sering ditemukan) sebelum terapi TAM dimulai.

Beberapa studi telah dilakukan yang melihat hubungan antara genotip CYP-P50 dengan kejadian hiperplasia endometrial. Studi yang dilakukan oleh Dieudonne *et al.*²⁹² di Belgia menunjukkan alel mutan rs1800716 variant CYP2D6 dihubungkan dengan meningkatnya risiko secara bermakna mengalami penebalan endometrium pada perempuan pascamenopause. Studi yang dilakukan Gunaldi *et al.*¹⁰⁴ di Turki memperlihatkan ada hubungan bermakna antara kejadian hiperplasia endometrial dengan fenotip PM pada alel CYP2D6*3/*4 dan *6/*6 pada subjek yang menggunakan TAM 20 mg/hari ($p = 0,01$).¹⁰⁴ Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh Okishiro *et al.*¹⁰⁵ di Jepang. Tidak ada hubungan antara penebalan dinding endometrium dengan alel CYP2D6 *10 *wild-type* maupun mutan, maupun CYP2C19.

Terlepas dari efek uterotropik TAM, studi yang dilakukan oleh Garuti *et al.*²⁸⁵ menunjukkan penderita KPD mempunyai risiko tinggi untuk mengalami proliferasi endometrium termasuk hiperplasia endometrial ditunjukkan dari tingginya prevalensi kelainan patologi yang ditemukan pada pemeriksaan penderita KPD yang melakukan pemeriksaan endometrium sebelum memulai terapi TAM.²⁸⁵

Berkaitan dengan abnormalitas endometrium penggunaan TAM, *the American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion* merekomendasikan: bagi perempuan pascamenopause yang mengonsumsi TAM harus dimonitor dengan ketat untuk gejala hiperplasia atau keganasan endometrium, sementara pada perempuan pramenopause tidak memerlukan monitoring tambahan selain pemeriksaan ginekologi rutin.²⁹³

5.10.4 Depresi

Hasil studi ini menunjukkan depresi ditemukan pada 7 subjek (5,7%) penelitian yang mengonsumsi TAM. Enam subjek mengalami depresi ringan dan 1 subjek dengan depresi berat. Tidak ditemukan hubungan bermakna antara depresi dan pencapaian MTC Z-END ($p = 0,71$; IK95% 0,14–3,05). Penderita kanker pada umumnya termasuk penderita KPD mempunyai risiko mengalami depresi.²⁹⁴ Prevalensi depresi pada survivor KPD di Asia dikatakan berkisar antara 19–26%.^{295, 296}

Tinjauan sistematik dari studi observasional menunjukkan ada multifaktor yang menyebabkan penderita KPD mengalami depresi antara lain: faktor sosiodemografik, faktor yang berkaitan dengan kanker dan terapi yang diberikan, fisiologi subjek, gaya hidup, dukungan sosial, dan kualitas hidup.²⁹⁷

Hormon steroid kelamin (estrogen, progesteron) mempunyai peran penting di dalam patogenesis ansietas melalui peningkatan jumlah noradrenalin, dan serotonin (neurotransmitter) di SSP neurotransmitter yang diketahui dan merupakan target obat-obat yang bekerja di dalam regulasi *mood* dan mengurangi kepekaan terhadap depresi.²⁹⁸

Ada beberapa mekanisme yang menjelaskan mekanisme hormon steroid kelamin dapat mencegah induksi depresi pada hewan coba antara lain dengan meningkatkan sintesis serotonin melalui peningkatan kadar enzim triptofan hidroksilase, menghambat degradasi serotonin oleh enzim monoamin oksidase, menghambat *reuptake* serotonin dari selah sinap ke neuron presinaptik, dan meningkatkan kadar reseptor serotonin melalui ekspresi gen.²⁹⁹

TAM sendiri mempunyai efek agonis parsial dalam arti efek antagonis yang dimiliki TAM dapat menghambat efek neuroprotektif estrogen yang akan membawa dampak terjadinya *down-regulation* neurotransmitter yang berhubungan dengan regulasi *mood* seperti halnya serotonin dan norepinefrin.³⁰⁰

Hingga saat ini masih kontroversial apakah penggunaan TAM pada manusia dapat menimbulkan efek depresi. Meningkatnya kejadian depresi³⁰¹ dan percobaan bunuh diri³⁰² dilaporkan pada penggunaan TAM, namun studi lain tidak menemukan adanya hubungan antara penggunaan TAM dan depresi.^{303, 304}

Studi hewan coba yang dilakukan oleh Azizi-Malekabadi *et al.*³⁰⁵ menunjukkan TAM mempunyai efek ganda, tergantung dari ada tidaknya hormon ovarium dalam menimbulkan efek terhadap ansietas atau depresi. TAM dapat menginduksi terjadinya ansietas dan depresi pada kondisi terdapat hormon ovarium (tidak dilakukan pengangkatan ovarium), diperkirakan karena TAM mengantagonis efek hormon ovarium dalam mencegah terjadinya ansietas dan depresi. Studi yang dilakukan oleh Calmarza-Font *et al.*³⁰⁶ menunjukkan pada kondisi tidak terdapat

hormon ovarium (dilakukan pengangkatan ovarium) TAM dapat mengurangi depresi yang diinduksi oleh stres.

The *American Society of Clinical Oncology* (ASCO)³⁰⁷ dalam pedoman praktik klinisnya yang berjudul *management of depression in patients with cancer* mengeluarkan rekomendasi yang berkaitan dengan penggunaan obat antidepresan. ASCO tidak merekomendasikan penggunaan antidepresan secara rutin pada gejala depresi *subthreshold* (tidak jelas) atau depresi ringan, namun hanya untuk depresi berat. Bila memungkinkan sebaiknya digunakan antidepresan dengan efek inhibisi CYP2D6 rendah (misalnya: sitalopram/escitalopram, venlafaksin/desvenlafaksin, sertraline dosis rendah (< 100–150 mg/hari) sebagai obat lini pertama.³⁰⁷

5.11 Kelebihan dan Keterbatasan Studi

Studi ini memiliki kelebihan dalam hal jumlah subjek yang cukup besar (125 orang). Pemilihan desain *cross-sectional* pada studi ini diharapkan dapat dipakai sebagai data dasar untuk penelitian selanjutnya yang lebih konklusif. Data penggunaan obat lain, *adherence*, dan *adverse event* yang terjadi ikut dilaporkan pada studi ini. Studi ini berhasil membuktikan bahwa fenotip lebih besar perannya secara bermakna dalam memprediksi kadar Z-END dalam plasma, sehingga dapat digunakan untuk memprediksi status metabolisme CYP2D6 sebagai dasar penentuan dosis TAM sebelum memulai terapi TAM.

Terlepas dari kelebihan di atas, studi ini juga memiliki kekurangan. Desain studi ini adalah *cross-sectional* yang bertujuan untuk melihat efek berbagai variabel terhadap kadar Z-END pada satu saat. Pemilihan desain studi ini menyebabkan tidak memungkinkan untuk menentukan hubungan sebab dan akibat karena pengambilan data risiko dan efek dilakukan pada satu saat yang bersamaan (*temporal relationship* tidak jelas). Tidak dilakukan randomisasi pada subjek studi menyebabkan dapat terjadi bias seleksi dan perancu karena tidak terbaginya variabel-variabel yang tidak diteliti pada kedua kelompok.¹⁹²

Pemeriksaan genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) pada studi ini juga memiliki limitasi antara lain: idealnya pemeriksaan genotip dilakukan terhadap gen CYP2D6 secara

utuh sehingga dapat diketahui semua varian yang ada,¹⁶⁵ namun karena keterbatasan dana penelitian maka pemeriksaan genotip hanya dilakukan pada 1 alel dengan frekuensi yang tinggi di Asia yaitu CYP2D6*10 (c.100C>T). Ada beberapa upaya yang dilakukan untuk memastikan hasil studi ini antara lain: hasil pemeriksaan genotip yang dilakukan dikonfirmasi dengan sekuensing, dan menggunakan sumber *germline* untuk pemeriksaan genotip dari darah.

5.12 Implikasi Klinis

Hasil studi ini menunjukkan fenotip seseorang dapat diprediksi dengan membandingkan MR DMP/DX pada jam ke-3 pasca konsumsi DMP 30 mg per oral dosis tunggal. Implikasi klinis dari hasil studi ini adalah individualisasi dosis TAM dapat dilakukan sebelum terapi TAM di mulai sehingga menghindarkan penderita KPD dari dosis subterapeutik.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 SIMPULAN

1. Persentase penderita KPD mencapai MTC Z-END dalam plasma dengan dosis TAM 20 mg/hari pada saat *steady state* adalah 52,8%.
2. Tidak ditemukan hubungan antara genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
3. Tidak ditemukan hubungan antara karakteristik demografik dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
4. Tidak ditemukan hubungan antara karakteristik klinik dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
5. Fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia.
6. Fenotip dan genotip memberikan kontribusi sebesar 55,2% terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma.

6.2 SARAN

1. Berdasarkan hasil studi ini hanya 52,8% penderita KPD mencapai MTC Z-END dalam plasma dengan dosis TAM 20 mg/hari pada saat *steady state*. sehingga masih diperlukan studi komparatif dengan desain yang baik untuk membandingkan TAM 20 mg/hari dengan TAM 30 atau 40 mg/hari pada subjek-subjek dengan kadar Z-END yang rendah. Tujuan dilakukannya TAM *dose escalation study* adalah untuk melihat tercapai atau tidaknya MTC Z-END. Data hasil studi ini dapat digunakan sebagai dasar studi lanjutan untuk melihat hubungan antara MTC Z-END dengan respons terapi (*disease free survival* dan *progression free survival*) pada penderita KPD di Indonesia.
2. Studi ini hanya melihat polimorfisme pada CYP2D6*10 (c.100C>T), sementara sudah diketahui sebelumnya bahwa metabolisme TAM bersifat kompleks.

Masih diperlukan penelitian untuk melihat peran polimorfisme genetik isoform sitokrom P450 lain (CY3A4, CYP2C9, CYP2C19) dan glukuroniltransferase terhadap kadar Z-END.

3. Pada studi ini terbukti fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia. *Phenotyping* menggunakan DMP 30 mg/hari perlu diterapkan pada penderita KPD di Indonesia sebelum memulai terapi TAM, namun sebelum diterapkan penggunaannya diperlukan validasi eksterna dengan melibatkan beberapa senter RS.Kanker di Indonesia.
4. Fenotip dan genotip memberikan kontribusi sebesar 55,2% terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma, sehingga belum cukup untuk menjelaskan adanya variasi kadar Z-END antar individu. Masih diperlukan penelitian terhadap faktor-faktor lain selain polimorfisme genetik CYP2D6*10 (c.100C>T), dan fenotip terhadap pencapaian kadar Z-END

RINGKASAN

LATAR BELAKANG

Kanker payudara (KPD) merupakan satu dari lima keganasan yang banyak ditemukan di dunia, termasuk di Indonesia. Besarnya masalah yang dihadapi menyebabkan diperlukan perhatian dalam penanganan KPD.

Tamoksifen (TAM) merupakan terapi hormonal yang digunakan saat ini pada penderita KPD di Indonesia. TAM merupakan *prodrug* yang perlu diaktivasi terutama oleh CYP2D6 menjadi *Zusammen*-endoksifen (Z-END). Pada penggunaan TAM masih banyak penderita yang mengalami kekambuhan selama terapi 5 tahun, dan salah satu faktor yang berperan dalam variasi respons terapi adalah kadar Z-END.

Studi menunjukkan Z-END di atas *minimal threshold concentration* (MTC) 5,9 ng/mL mempunyai risiko 26% lebih rendah mengalami kekambuhan secara bermakna dibandingkan dengan kelompok yang kadar Z-END di bawah 5,9 ng/mL. Tinggi rendahnya kadar MTC Z-END antara lain dipengaruhi oleh polimorfisme gen CYP2D6.

Studi menunjukkan adanya ketidaksesuaian (*disconcordance*) antara pengukuran fenotip secara langsung (*phenotyping*) dan estimasi fenotip berdasarkan genotip. Genotip hanya menunjukkan alel potensial yang membawa dampak klinis pada respons terapi, namun tidak dapat memberikan gambaran aktivitas enzim CYP2D6 individu secara akurat. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan hubungan antara genotip dan fenotip CYP2D6 dengan pencapaian kadar MTC Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD.

METODE

Studi ini menggunakan desain potong lintang, dengan pemilihan subjek secara konsekutif dilakukan pada bulan Oktober 2017–Februari 2018 di RS. Kanker Dharmais, Jakarta, Indonesia. Sebanyak 125 orang penderita kanker payudara rawat jalan yang menggunakan TAM 20 mg/hari minimal selama 4 bulan diikuti sertakan dalam penelitian ini. Kriteria eksklusi dari studi ini adalah kadar *serum glutamic pyruvic transaminase* (SGPT) > 2,5 kali di atas batas normal.

Sebanyak 125 sampel darah vena (*whole blood*) dengan volume 5 mL diperoleh dan disimpan dalam tabung yang mengandung *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) untuk pemeriksaan kadar Z-END dan genotyping. Data karakteristik dasar dan klinik, interaksi obat potensial, dan *drug adherence* ikut dicatat dalam studi ini. *Adherence* TAM ditentukan menggunakan kuesioner *Morisky Medication Adherence Scale-8* (MMAS-8). Sampel darah untuk pemeriksaan genotip dan kadar Z-END diambil 6–24 jam pasca konsumsi TAM. Fenotip subjek studi ditentukan menggunakan MR DMP/DX yang diukur tiga jam pasca konsumsi DMP 30 mg per oral. Analisis data dilakukan menggunakan uji Chi-square, uji Mann Whitney dan regresi logistik ganda. Tingkat kemaknaan yang digunakan adalah $p < 0,05$.

HASIL

Karakteristik dasar subjek studi adalah sebagai berikut: sebagian besar subjek studi 119 orang (95,2%) nonlansia dengan rerata usia 44.5 ± 7.4 tahun, IMT sebagian besar subjek atau 50 orang (40,0%) adalah obesitas, sebagian besar subjek yaitu 110 orang (88,0%) tidak mengalami *non-alcoholic fatty liver disease*, sebanyak 75 orang (60%) tidak memiliki riwayat kemoterapi sebelumnya, dan sebanyak 54 orang (42,2%) memiliki *adherence* sedang. Persentase genotip terbanyak subjek studi adalah homozigot mutan (T/T) adalah 28 subjek (48,0%). Hasil analisis menunjukkan ada perbedaan kadar Z-END yang bermakna antara kelompok genotip T/T dengan kelompok genotip C/C, dan C/T ($p < 0,001$). Persentase fenotip PM ditemukan sebesar 48,8% pada subjek studi dan non-PM sebesar 51,2 %. Kadar Z-END pada fenotip non-PM sebesar 9,81 (7,36–14,59) dan PM yaitu sebesar 3,32 (2,51–4,66) ng/mL ($p < 0,001$).

Hasil analisis regresi logistik menunjukkan ada hubungan bermakna secara statistik antara fenotip dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma. Genotip tidak berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END plasma ($p = 0,05$), namun dimasukkan dalam pemodelan akhir karena secara substansi mempunyai kontribusi yang besar di dalam penentuan fenotip subjek studi. Genotip dan fenotip mempunyai $R \text{ square} = 55,2\%$.

Probabilitas subjek dengan genotip non-T/T untuk mencapai kadar Z-END $\geq 5,9$ ng/mL adalah 45,6%, sementara fenotip non-PM sebesar 71,7%. Probabilitas

subjek yang memiliki genotip non-T/T dan fenotip non-PM untuk mencapai kadar Z-END $\geq 5,9$ ng/mL adalah 88,3%

PEMBAHASAN

Hasil studi ini menunjukkan hanya 52,8% subjek yang mencapai MTC Z-END (5,9 ng/mL). Studi yang dilakukan di Amsterdam menunjukkan sebanyak 78% pasien mencapai kadar Z-END 5,9 ng/mL, sementara studi yang dilakukan di Polandia menunjukkan sebanyak 40,1% pasien mempunyai kadar Z-END di atas 5,9 ng/mL.

Selain faktor genetik yang dipengaruhi oleh etnik, faktor lingkungan juga dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma. Variasi kadar Z-END antar subjek pada studi ini salah satunya mungkin bisa disebabkan oleh terjadinya kolestasis akibat asupan hormon estrogen dari penggunaan kontrasepsi hormonal atau dari sumber lainnya seperti yang ditunjukkan studi hewan coba.

Hasil studi ini menunjukkan persentase genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) homozigot mutan (T/T) merupakan genotip yang terbanyak yaitu sebesar 48.0%, diikuti heterozigot mutan (C/T) yaitu sebesar 29.6%, dan homozigot *wild-type* (C/C) yaitu sebesar 22.4%. Hasil studi ini berbeda dengan studi di Filipina dan Cina yang menunjukkan persentase fenotip terbanyak adalah C/T. Hasil studi kami mengkonfirmasi walaupun sesama etnik Asia, prevalensi CYP2D6*10 (c.100C>T) berbeda antar etnik.

Berdasarkan hasil studi ini terlihat bahwa subjek yang memiliki genotip C/T tidak mengubah kadar Z-END dalam plasma secara bermakna, sebaliknya pada subjek dengan genotip T/T dapat mengubah kadar Z-END dalam plasma secara bermakna. Studi yang dilakukan di Cina oleh Lei *et al.* menunjukkan hasil yang sama dengan hasil penelitian kami yaitu kadar genotip T/T memiliki kadar END secara bermakna paling rendah dibandingkan kedua genotip lainnya. Walaupun ada perbedaan presentasi data antara studi ini dengan studi Lei *et al.*, hasil studi ini konsisten dengan studi yang dilakukan oleh Lei *et.al.* bahwa kadar Z-END dalam plasma akan berubah bila substitusi basa/mutasi terjadi pada kedua basa penyusun alel CYP2D6*10 yang fungsional. Ada multipel faktor yang dapat memengaruhi kadar Z-END dalam plasma selain genotip CYP2D6 antara lain penggunaan TAM

bersama dengan obat lain seperti paroxetin/fluoksetin, rifampisin, dan *adherence* juga dapat memengaruhi kadar Z-END.

Hasil studi kami menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap median (25–75%) kadar Z-END berdasarkan kelompok fenotip. Sebanyak 82,0% subjek dengan fenotip PM dan 14,1% subjek fenotip non-PM memiliki kadar Z-END plasma di bawah MTC, dan terdapat hubungan bermakna secara statistik antara fenotip dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma ($p < 0,001$).

Berdasarkan hipotesis fenotip PM dan genotip T/T seharusnya memiliki kadar Z-END $< 5,9$ ng/mL, namun ditemukan ketidaksesuaian (*discordance*) antara genotip dan fenotip terhadap kadar Z-END. Pada studi ini ditemukan subjek dengan fenotip PM (18,0%) dan genotip T/T (23,3%) memiliki kadar Z-END $\geq 5,9$ ng/mL. Fenotip tampaknya lebih besar kemampuannya untuk menjelaskan variasi kadar Z-END antar individu. Hasil studi ini konsisten dengan studi terdahulu yang juga menunjukkan ada ketidaksesuaian antara genotip dan fenotip.

Hasil studi kami menunjukkan ada hubungan antara fenotip dengan pencapaian kadar Z-END dalam plasma. Genotip tidak berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END plasma, namun dimasukkan dalam pemodelan akhir karena secara substansi mempunyai kontribusi yang besar di dalam penentuan fenotip subjek studi. Ternyata genotip dan fenotip mampu menjelaskan variasi kadar Z-END sebesar 55,2% dalam pencapaian kadar Z-END dalam plasma. Fenotip merupakan satu-satunya variabel yang berhubungan dengan pencapaian kadar Z-END, maka berdasarkan hasil studi ini fenotip bisa digunakan sebelum memulai terapi dan mudah untuk diaplikasikan pada penderita KPD di Indonesia.

Kekuatan penelitian kami adalah jumlah subjek yang cukup besar (125 orang), penggunaan obat lain, *adherence*, dan adverse event yang terjadi ikut dilaporkan pada studi ini, dan studi ini berhasil membuktikan bahwa fenotip lebih besar perannya secara bermakna dalam memprediksi kadar Z-END dalam plasma, sehingga dapat digunakan untuk memprediksi status metabolisme CYP2D6 sebagai dasar penentuan dosis TAM.

Beberapa keterbatasan penelitian kami adalah: 1) desain yang digunakan *cross-sectional*, yang tidak dapat menentukan adanya hubungan sebab akibat (*temporal*

relationship) antara berbagai variabel terhadap kadar Z-END; 2) tidak dilakukan randomisasi pada subjek studi menyebabkan dapat terjadi bias seleksi dan perancu karena tidak terbaginya variabel-variabel yang tidak diteliti pada kedua kelompok; 3) pemeriksaan genotip CYP2D6*10 (c.100C>T) tidak dilakukan secara utuh dan hanya dilakukan pada 1 alel dengan frekuensi yang tinggi di Asia yaitu CYP2D6*10 (c.100C>T).

Hasil studi ini menunjukkan fenotip seseorang dapat diprediksi dengan membandingkan MR DMP/DX pada jam ke-3 pasca konsumsi DMP 30 mg per oral dosis tunggal. Implikasi klinis dari hasil studi ini adalah individualisasi dosis TAM dapat dilakukan sebelum terapi TAM di mulai sehingga menghindarkan penderita KPD dari dosis subterapeutik.

SIMPULAN DAN SARAN

Persentase penderita KPD mencapai MTC Z-END dalam plasma dengan dosis TAM 20 mg/hari pada saat *steady state* adalah 52,8%. Fenotip merupakan satu-satunya variabel berhubungan secara bermakna terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma pada saat *steady state* pada penderita KPD di Indonesia. Fenotip dan genotip memberikan kontribusi sebesar 55,2% terhadap pencapaian kadar Z-END dalam plasma.

Masih diperlukan penelitian lebih lanjut melihat hubungan MTC Z-END dengan survival, *dose escalation study* adalah untuk melihat tercapai atau tidaknya MTC Z-END, dan melihat peran polimorfisme genetik isoform sitokrom P450 lain (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19) dan glukuroniltransferase terhadap kadar Z-END.

SUMMARY

BACKGROUND

Breast cancer (BC) is one of the five most frequently found malignancies in the world, including Indonesia. The size of the problem calls for attention to BC management.

Tamoxifen (TAM) is the hormonal therapy currently used in BC patients in Indonesia. Tamoxifen is a prodrug that needs to be activated particularly by CYP2D6 into *Zusammen*-endoxifen (Z-END). There are still many patients on TAM who have recurrences after 5 years of treatment and one of the factors that plays a role in the variation in therapeutic response is the Z-END concentration.

Studies have shown that a Z-END concentration above the minimal threshold concentration (MTC) of 5.9 ng/mL carries a 26% significantly lower risk for recurrences than does a Z-END concentration below 5.9 ng/mL. The Z-END MTC is among others influenced by CYP2D6 gene polymorphism.

It has been shown that there is a discordance between direct phenotyping and estimation of phenotype based on genotype. The genotype only shows the alleles that potentially have clinical impact on the therapeutic response, but cannot accurately depict the activity of individual CYP2D6 enzymes. The aim of the present study was to determine any association of CYP2D6 genotype and phenotype with attainment of steady-state plasma Z-END MTC in BC patients in Indonesia, since to date there is no information on such association.

METHODS

This cross-sectional study, for which the subjects were recruited consecutively, was conducted from October 2017 to February 2018 at the Dharmais Cancer Hospital, Jakarta, Indonesia. A total of 125 ambulatory BC patients using TAM 20 mg/day for at least 4 months were invited to participate in this study. The exclusion criterion was a serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) concentration of > 2.5 times above the normal limit.

A total of 125, 5-mL venous whole blood samples were obtained and stored in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for determination of Z-

END concentrations and genotyping. Data on baseline and clinical characteristics, potential drug interactions, and drug adherence were also recorded in this study. TAM adherence was determined using the Morisky Medication Adherence Scale-8 (MMAS-8) questionnaire. Blood samples for genotyping and Z-END concentration were collected 6–24 hours after TAM consumption. The phenotype of the subjects was determined using the DMP/DX MR, which was measured three hours after oral consumption of 30 mg DMP. Data analysis was performed by means of the chi-square test, the Mann-Whitney test and logistic regression. The level of significance used was $p < 0.05$.

RESULTS

The baseline characteristics of the study subjects were as follows: the majority of subjects (119 subjects or 95.2%) were non-elderly with mean age of 44.5 ± 7.4 years; the BMI of the majority of subjects (50 subjects or 40.0%) was in the obese category. The majority of subjects (110 or 88.0%) did not have non-alcoholic fatty liver disease, 75 subjects (60%) had no history of chemotherapy, and most of the study subjects (54 or 42.2%) had moderate drug adherence.

The highest genotype percentage of the study subjects was for the homozygous mutant (T/T) of 28 subjects (48.0%). The results of the statistical analysis showed a significant difference in Z-END concentration between the T/T versus the C/C and C/T genotype groups ($p < 0.001$). The percentages of the PM and non-PM phenotypes in the study subjects were 48.8% and 51.2%, respectively. The median (min–max) Z-END concentrations in the PM and non-PM phenotypes were 3.32 (2.51–4.66) ng/mL and 9.81 (7.36–14.59), respectively ($p < 0.001$).

The results of logistic regression analysis showed a statistically significant association between phenotype and attainment of plasma Z-END concentration. Genotype was not associated with attainment of plasma Z-END concentration ($p = 0.05$), but was included in the final modeling, since it contributed substantially to phenotype determination of the study subjects. Genotype and phenotype had an R square of 55.2%.

The probability of subjects with a non-T/T genotype attaining Z-END concentrations of ≥ 5.9 ng/mL was 45.6%, while that of subjects with the non-PM phenotype was 71.7%. The probability of subjects with a non-T/T genotype and the non-PM phenotype attaining Z-END concentrations of ≥ 5.9 ng/mL was 88.3%.

DISCUSSION

The results of our study showed that only 52.8% subjects reached the Z-END MTC of 5.9 ng/mL. A study conducted in Amsterdam found that 78% of patients attained a Z-END concentration of 5.9 ng/mL, whereas a study in Poland showed that only 40.1% of patients had a Z-END concentration above 5.9 ng/mL.

In addition to genetic factors that are influenced by ethnicity, environmental factors may also affect plasma Z-END concentration. The variation in Z-END concentration between the subjects in this study may have been caused by cholestasis as a result of estrogen input from the use of hormonal contraception or from other sources, as shown in studies on experimental animals.

Our study results showed the percentage of the CYP2D6*10 (c.100C>T) homozygous mutant (T/T) to be the highest at 48.0%, followed by the heterozygous mutant (C/T) at 29.6% and the homozygous wild-type (C/C) at 22.4%. These results differed from those of studies in the Philippines and China, where the highest percentage was for the C/T genotype. Our study results confirm that the prevalences of CYP2D6*10 (c.100C>T) differ between ethnic groups, although all are Asian.

Based on our study results, subjects with the C/T genotype apparently did not significantly change the plasma Z-END concentration, in contrast with subjects with the T/T genotype. The study conducted in China by Lei *et al.* showed similar results, in that the T/T genotype had significantly the lowest END concentration as compared with the other two genotypes. Although there are differences in the presentation of the data between the present study and that of Lei *et al.*, both showed that the plasma Z-END concentration changes upon the occurrence of base substitutions or mutations in both the bases composing the functional CYP2D6*10 alleles. There are multiple factors capable of affecting plasma Z-END concentration in addition to CYP2D6 genotype, such as the use of TAM in conjunction with other

drugs (e.g. paroxetine/fluoxetine, rifampicin), and drug adherence, that may influence Z-END concentration.

The results of our study showed a statistically significant difference in the median (25–75%) Z-END concentration between the phenotype groups. A total of 82.0% of PM phenotype subjects and 14.1% of non-PM phenotype subjects had a plasma Z-END concentration below the MTC and there was a statistically significant association between phenotype and attainment of plasma Z-END concentration ($p < 0.001$).

Based on the hypothesis, the PM phenotype and the T/T genotype should have a Z-END concentration of < 5.9 ng/mL, but there was discordance of genotype and phenotype with Z-END concentration. In this study it was found that subjects with the PM phenotype (18.0%) and the T/T genotype (23.3%) had a Z-END concentration of ≥ 5.9 ng/mL. Phenotype can apparently give a better explanation for the variation in Z-END concentration between individuals. The results of this study are consistent with those of previous studies, which also showed a discordance between genotype and phenotype.

Our study results showed an association between phenotype and attainment of plasma Z-END concentration. Genotype was not associated with attainment of plasma Z-END concentration ($p = 0.05$), but was included in the final modeling because it substantially contributes to the determination of phenotype in the study subjects. Apparently genotype and phenotype were capable of explaining 55.2% of the variation in the attainment of plasma Z-END concentration. Phenotype is the sole variable that is associated with attainment of Z-END concentration, therefore based on the results of this study phenotype may be used to determine TAM therapeutic dose prior to starting treatment and can readily be applied to BC patients in Indonesia.

The strengths of this study lie in the relatively large number of subjects (125 persons), in the reporting of the use of other drugs, drug adherence, and the occurrence of adverse events, and in the proving that phenotype has a significantly greater role in predicting plasma Z-END concentration, so that it may be used for predicting the metabolic status of CYP2D6 as basis for determining the TAM dose.

Three of the limitations of our study are: 1) the design of this study was cross-sectional, which could not determine any cause-and-effect relationship (temporal relationship) between the various variables and the Z-END concentration; 2) there was no randomization of the study subjects, resulting in the possibility of selection and confounding bias, due to the uneven distribution of the variables not under investigation in the two groups; 3) the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotyping was not on the complete set of genotypes, and was only performed for one allele of high frequency in Asia, i.e. CYP2D6*10 (c.100C>T).

The results of the present study shows that an individual's phenotype may be predicted from the DMP/DX MR value at 3 hours after consumption of a single oral dose of 30 mg DMP. The clinical implication of these results is that individualization of the TAM dose may be performed prior to starting TAM therapy, thus preventing BC patients from receiving subtherapeutic doses.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

The percentage of patients with BC attaining plasma steady-state Z-END MTC with a TAM dose of 20 mg/day is 52.8%. Phenotype is the sole variable significantly associated with attainment of plasma steady-state Z-END concentration in BC patients in Indonesia. Phenotype and genotype contribute to 55.2% of the attainment of plasma Z-END concentration.

There is still a need for further studies on the association of Z-END MTC with survival, for dose escalation studies to determine attainment of Z-END MTC, and studies to determine the role of genetic polymorphism of other cytochrome P450 isoforms (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19) and of glucuronyltransferase on Z-END concentration.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

1. Kimman M, Norman R, Jan S, Kingston D, Woodward M. The Burden of Cancer in Member Countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012;13:411–20.
2. Youlten DR, Cramb SM, Yip CH, Baade PD. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med.* 2014;11:101–15.
3. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004;9:606–16.
4. Cao SS, Lu CT. Recent perspectives of breast cancer prognosis and predictive factors. *Oncology letters.* 2016;12:3674–8.
5. Chan DS, Vieira AR, Aune D, Bandera EV, Greenwood DC, McTiernan A, et al. Body mass index and survival in women with breast cancer-systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. *Ann Oncol.* 2014;25:1901–14.
6. Bowen RL, Stebbing J, Jones LJ. A review of the ethnic differences in breast cancer. *Pharmacogenomics.* 2006;7:935–42.
7. McCaskill-Stevens W, Wilson J, Bryant J, Mamounas E, Garvey L, James J, et al. Contralateral breast cancer and thromboembolic events in African American women treated with tamoxifen. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004;96:1762–9.
8. Data Registrasi Kanker RS. Kanker Dharmais Indonesia. Forthcoming 2018.
9. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:2206–23.
10. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. Breast Cancer, Version 4.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16:310–20.
11. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26:1533–46.
12. Purwanto P HD, Haryono SJ, Harahap WA, penyunting. Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara 2015 ed. Jakarta: Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI); 2015.
13. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:1062–75.

14. Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res.* 1982;42:317–23.
15. Stearns V, Johnson M, Rae J, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active Tamoxifen Metabolite Plasma Concentrations After Coadministration of Tamoxifen and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1758–64.
16. Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, et al. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:30–9.
17. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:718–25.
18. Fotoohi AK, Karim H, Lafolie P, Pohanka A, Ostervall J, Hatschek T, et al. Pronounced Interindividual But Not Intraindividual Variation in Tamoxifen and Metabolite Levels in Plasma During Adjuvant Treatment of Women With Early Breast Cancer. *Ther Drug Monit.* 2016;38:239–45.
19. Jager NG, Rosing H, Schellens JH, Linn SC, Beijnen JH. Tamoxifen dose and serum concentrations of tamoxifen and six of its metabolites in routine clinical outpatient care. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;143:477–83.
20. Hershman DL, Shao T, Kushi LH, Buono D, Tsai WY, Fehrenbacher L, et al. Early discontinuation and non-adherence to adjuvant hormonal therapy are associated with increased mortality in women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126:529–37.
21. Lien EA, Soiland H, Lundgren S, Aas T, Steen VM, Mellgren G, et al. Serum concentrations of tamoxifen and its metabolites increase with age during steady-state treatment. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141:243–8.
22. Wu AH, Pike MC, Williams LD, Spicer D, Tseng CC, Churchwell MI, et al. Tamoxifen, soy, and lifestyle factors in Asian American women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:3024–30.
23. Teft WA, Gong IY, Dingle B, Potvin K, Younus J, Vandenberg TA, et al. CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:95–105.
24. Binkhorst L, Kloth JSL, de Wit AS, de Bruijn P, Lam MH, Chaves I, et al. Circadian variation in tamoxifen pharmacokinetics in mice and breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;152:119–28.
25. Binkhorst L, van Gelder T, Loos WJ, de Jongh FE, Hamberg P, Moghaddam-Helmantel IM, et al. Effects of CYP induction by rifampicin on tamoxifen exposure. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92:62–7.

26. Binkhorst L, Mathijssen RH, van Herk-Sukel MP, Bannink M, Jager A, Wiemer EA, et al. Unjustified prescribing of CYP2D6 inhibiting SSRIs in women treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:923–9.
27. Antunes MV, Linden R, Santos TV, Wallemacq P, Haufroid V, Classen J-F, et al. Endoxifen levels and its association with CYP2D6 genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. *Ther Drug Monit.* 2012;34:422–31.
28. Antunes MV, Timm TA, de Oliveira V, Staudt DE, Raymundo S, Gossling G, et al. Influence of CYP2D6 and CYP3A4 Phenotypes, Drug Interactions, and Vitamin D Status on Tamoxifen Biotransformation. *Ther Drug Monit.* 2015;37:733–44.
29. Sohn DR, Shin SG, Park CW, Kusaka M, Chiba K, Ishizaki T. Metoprolol oxidation polymorphism in a Korean population: comparison with native Japanese and Chinese populations. *Br J Clin Pharmacol.* 1991;32:504–7.
30. Charoenchokthavee W, Panomvana D, Sriuranpong V, Areepium N. Prevalence of CYP2D6*2, CYP2D6*4, CYP2D6*10, and CYP3A5*3 in Thai breast cancer patients undergoing tamoxifen treatment. *Breast Cancer.* 2016;8:149–55.
31. Setiabudy R, Kusaka M, Chiba K, Darmansjah I, Ishizaki T. Dapsone N-acetylation, metoprolol alpha-hydroxylation, and S-mephenytoin 4-hydroxylation polymorphisms in an Indonesian population: a cocktail and extended phenotyping assessment trial. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;56:142–53.
32. Lim JS, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RC, Wong NS, et al. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71:737–50.
33. Areepium N, Panomvana D, Rungwanonchai P, Sathaporn S, Voravud N. Effects of CYP2D6 and UGT2B7 polymorphisms on pharmacokinetics of tamoxifen in Thai breast cancer patients. *Breast Cancer.* 2013;5:73–8.
34. Lei L, Wang X, Wu XD, Wang Z, Chen ZH, Zheng YB, et al. Association of CYP2D6*10 (c.100C>T) polymorphisms with clinical outcome of breast cancer after tamoxifen adjuvant endocrine therapy in Chinese population. *Am J Transl Res.* 2016;8:3585–92.
35. Chamnanphon M, Pechatanan K, Sirachainan E, Trachu N, Chantratita W, Pasomsub E, et al. Association of CYP2D6 and CYP2C19 polymorphisms and disease-free survival of Thai post-menopausal breast cancer patients who received adjuvant tamoxifen. *Pharmgenomics Pers Med.* 2013;6:37–48.
36. Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, Pagani O, Tang W, Kammler R, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:441–51.

37. Rae JM, Drury S, Hayes DF, Stearns V, Thibert JN, Haynes BP, et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:452–60.
38. Goetz MP, Suman VJ, Hoskin TL, Gnant M, Filipits M, Safgren SL, et al. CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSG) 8. *Clin Cancer Res.* 2013;19:500–7.
39. Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, et al. CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95:216–27.
40. De Andres F, Teran S, Hernandez F, Teran E, A LL. To Genotype or Phenotype for Personalized Medicine? CYP450 Drug Metabolizing Enzyme Genotype-Phenotype Concordance and Discordance in the Ecuadorian Population. *OMICS.* 2016;20:699–710.
41. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:321–33.
42. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Brakenhoff JP, Gerrits MG, de Zeeuw RA, et al. An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP2D6 and CYP2C19. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;57:143–6.
43. Hennig EE, Piatkowska M, Karczmariski J, Goryca K, Brewczynska E, Jazwiec R, et al. Limited predictive value of achieving beneficial plasma (Z)-endoxifen threshold level by CYP2D6 genotyping in tamoxifen-treated Polish women with breast cancer. *BMC Cancer.* 2015;15:570–81.
44. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med.* 2005;9:208–21.
45. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 2001;358:1389–99.
46. Ali S, Mondal N, Choudhry H, Rasool M, Pushparaj PN, Khan MA, et al. Current Management Strategies in Breast Cancer by Targeting Key Altered Molecular Players. *Front Oncol.* 2016;6:45–53.
47. Melmed S PK, Larsen PR, Kronenberg HM. William Textbook of Endocrinology, 12 th ed.,. 12 th ed ed: Saunders press, Philadelphia, PA, 2011, pp.599–602.
48. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* 2015;356:231–43.
49. Thomas MP, Potter BV. The structural biology of oestrogen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;137:27–49.
50. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;86:225–30.
51. Carroll JS. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol.* 2016;175:R41–9.

52. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev.* 2013;65:710–78.
53. Matthews J, Gustafsson J-Å. Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β . *Mol Interv.* 2003;3:281–292.
54. Omoto Y, Iwase H. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci.* 2015;106:337–43.
55. Lipovka Y, Konhilas JP. The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: enemy or ally? *Biosci Rep.* 2016;36–46.
56. Dey P, Barros RP, Warner M, Strom A, Gustafsson JA. Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor beta in the breast, prostate, colon, and CNS. *J Mol Endocrinol.* 2013;51:T61–74.
57. Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, et al. Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2001;60:595–602.
58. Paruthiyil S, Cvorovic A, Tagliaferri M, Cohen I, Shtivelman E, Leitman DC. Estrogen receptor beta causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129:777–84.
59. Pettersson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:165–92.
60. Shehu A, Albarracin C, Devi YS, Luther K, Halperin J, Le J, et al. The stimulation of HSD17B7 expression by estradiol provides a powerful feed-forward mechanism for estradiol biosynthesis in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2011;25:754–66.
61. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:597–608.
62. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2009.p.419–60.
63. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy.* 2010;10:955–60.
64. Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer.* 2015;9:17–34.
65. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24:vi7–23.
66. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive

- breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 2014;32:2255–69.
67. Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev*. 2011;63:437–59.
 68. Faheem M, Mahmood H, Khurram M, Qasim U, Irfan J. Estrogen receptor, progesterone receptor, and Her 2 Neu positivity and its association with tumour characteristics and menopausal status in a breast cancer cohort from northern Pakistan. *Ecancermedicallscience*. 2012;6:283–90.
 69. Bae SY, Kim S, Lee JH, Lee HC, Lee SK, Kil WH, et al. Poor prognosis of single hormone receptor- positive breast cancer: similar outcome as triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:138–47.
 70. Nakajima H, Fujiwara I, Mizuta N, Sakaguchi K, Hachimine Y, Konishi E, et al. Prognosis of Japanese breast cancer based on hormone receptor and HER2 expression determined by immunohistochemical staining. *World J Surg*. 2008;32:2477–82.
 71. dos Santos Borges G, Colchon Paulo H, Staak Marcos Jr C, Girardi F, Rosar KC, Zamboni F, et al. Analysis of Disease-free Survival and Overall Survival in Patients with Luminal A Breast Cancer Stratified According to TNM. *Klin Onkol*. 2014;27:178–83.
 72. Tang LC, Jin X, Yang HY, He M, Chang H, Shao ZM, et al. Luminal B subtype: a key factor for the worse prognosis of young breast cancer patients in China. *BMC Cancer*. 2015;15:201–7.
 73. Kataoka A, Iwamoto T, Tokunaga E, Tomotaki A, Kumamaru H, Miyata H, et al. Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;160:163–72.
 74. Chen HL, Zhou MQ, Tian W, Meng KX, He HF. Effect of Age on Breast Cancer Patient Prognoses: A Population-Based Study Using the SEER 18 Database. *PLoS One*. 2016;11:e0165409–22.
 75. Vinayagam R, Sibson DR, Holcombe C, Aachi V, Davies MP. Association of oestrogen receptor beta 2 (ER beta 2/ER beta cx) with outcome of adjuvant endocrine treatment for primary breast cancer--a retrospective study. *BMC Cancer*. 2007;7:131–9.
 76. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K, et al. Clinical importance of estrogen receptor- β evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:3727–34.
 77. Saji S, Omoto Y, Shimizu C, Warner M, Hayashi Y, Horiguchi S, et al. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res*. 2002;62:4849–53.

78. Tan W, Li Q, Chen K, Su F, Song E, Gong C. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7:10373–85.
79. Maccio A, Madeddu C. Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:2020–36.
80. Sun X, Nichols HB, Robinson W, Sherman ME, Olshan AF, Troester MA. Post-diagnosis adiposity and survival among breast cancer patients: influence of breast cancer subtype. *Cancer Causes Control*. 2015;26:1803–11.
81. Zheng Q, Xu F, Nie M, Xia W, Qin T, Qin G, et al. Selective Estrogen Receptor Modulator-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease Improved Survival in Patients With Breast Cancer: A Retrospective Cohort Analysis. *Medicine*. 2015;94:e1718–26.
82. Arturi F, Succurro E, Procopio C, Pedace E, Mannino GC, Lugara M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E1640–4.
83. Zhang Y, Moerkens M, Ramaiahgari S, de Bont H, Price L, Meerman J, et al. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R52–68.
84. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138:103–41.
85. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48:689–723.
86. Gaedigk A. Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. *Int Rev Psychiatry*. 2013;25:534–53.
87. Batty JA, Hall AS, White HL, Wikstrand J, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, et al. An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95:321–30.
88. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database Allele nomenclature for Cytochrome P450 enzymes 2018 [cited 2018 May 2]. Available from: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp2d6.htm>.
89. Fernandez-Santander A, Gaibar M, Novillo A, Romero-Lorca A, Rubio M, Chicharro LM, et al. Relationship between genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and tamoxifen metabolism in breast cancer patients. *PLoS One*. 2013;8:e70183–93.
90. Chin FW, Chan SC, Abdul Rahman S, Noor Akmal S, Rosli R. CYP2D6 Genetic Polymorphisms and Phenotypes in Different Ethnicities of Malaysian Breast Cancer Patients. *Breast J*. 2016;22:54–62.

91. Food and Drug Administration (FDA). Novaldex (Tamoxifen Citrate) 2018 [cited 2018 June 14]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/1998/17970.pdf.
92. Lu WJ, Desta Z, Flockhart DA. Tamoxifen metabolites as active inhibitors of aromatase in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131:473–81.
93. Kojetin DJ, Burris TP, Jensen EV, Khan SA. Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15:851–70.
94. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*. 2003;348:618–29.
95. Gjerde J, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Haugan Moi LL, Aristarco V, Mellgren G, et al. Tissue distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and tamoxifen-N-oxide. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134:693–700.
96. Chen G, Yin S, Maiti S, Shao X. 4-Hydroxytamoxifen sulfation metabolism. *J Biochem Mol Toxicol*. 2002;16:279–85.
97. Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23:643–7.
98. Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69:1722–7.
99. Obach RS. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2013;65:578–640.
100. Perez DG, Zahasky KM, Loprinzi CL, Sloan J, Novotny P, Barton D, et al. Tamoxifen-associated hot flashes in women. *Support Cancer Ther*. 2007;4:152–6.
101. Lorizio W, Wu AH, Beattie MS, Rugo H, Tchu S, Kerlikowske K, et al. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132:1107–18.
102. Irvin WJ, Jr., Walko CM, Weck KE, Ibrahim JG, Chiu WK, Dees EC, et al. Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J Clin Oncol*. 2011;29:3232–9.
103. Jager NG, Koornstra RH, Vincent AD, van Schaik RH, Huitema AD, Korse TM, et al. Hot flashes are not predictive for serum concentrations of tamoxifen and its metabolites. *BMC Cancer*. 2013;13:612–22.
104. Gunaldi M, Erkisi M, Afsar CU, Ercolak V, Paydas S, Kara IO, et al. Evaluation of endometrial thickness and bone mineral density based on CYP2D6

- polymorphisms in Turkish breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Pharmacology*. 2014;94:183–9.
105. Okishiro M, Taguchi T, Jin Kim S, Shimazu K, Tamaki Y, Noguchi S. Genetic polymorphisms of CYP2D6 10 and CYP2C19 2, 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*. 2009;115:952–61.
 106. Bergman L, Beelen ML, Gallee MP, Hollema H, Benraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. *Lancet*. 2000;356:881–7.
 107. Pan HJ, Chang HT, Lee CH. Association between tamoxifen treatment and the development of different stages of nonalcoholic fatty liver disease among breast cancer patients. *J Formos Med Assoc*. 2016;115:411–7.
 108. Sun LM, Chen HJ, Liang JA, Li TC, Kao CH. Association of tamoxifen use and increased diabetes among Asian women diagnosed with breast cancer. *Br J Cancer*. 2014;111:1836–42.
 109. Murphy CC, Bartholomew LK, Carpentier MY, Bluethmann SM, Vernon SW. Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134:459–78.
 110. Lash TL, Fox MP, Westrup JL, Fink AK, Silliman RA. Adherence to tamoxifen over the five-year course. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;99:215–20.
 111. Rae JM, Sikora MJ, Henry NL, Li L, Kim S, Oesterreich S, et al. Cytochrome P450 2D6 activity predicts discontinuation of tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2009;9:258–64.
 112. Wu X, Subramaniam M, Grygo SB, Sun Z, Negron V, Lingle WL, et al. Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R27–39.
 113. Hawse JR, Subramaniam M, Cicek M, Wu X, Gingery A, Grygo SB, et al. Endoxifen's molecular mechanisms of action are concentration dependent and different than that of other anti-estrogens. *PLoS One*. 2013;8:e54613–32.
 114. Berry D. CYP2D6 genotyping and the use of tamoxifen in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:1267–9.
 115. Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA*. 2009;302:1429–36.
 116. Jung JA, Lim HS. Association between CYP2D6 genotypes and the clinical outcomes of adjuvant tamoxifen for breast cancer: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2014;15:49–60.

117. Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:160–6.
118. Goetz MP, Ingle JN. CYP2D6 genotype and tamoxifen: considerations for proper nonprospective studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96:141–4.
119. Murdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, Winter S, Heinkele G, Simon W, et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:708–17.
120. Saladores P, Murdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, et al. Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.* 2015;15:84–94.
121. Love RR, Desta Z, Flockhart D, Skaar T, Ogburn ET, Ramamoorthy A, et al. CYP2D6 genotypes, endoxifen levels, and disease recurrence in 224 Filipino and Vietnamese women receiving adjuvant tamoxifen for operable breast cancer. *SpringerPlus.* 2013;2:52–6.
122. Xu Y, Sun Y, Yao L, Shi L, Wu Y, Ouyang T, et al. Association between CYP2D6 *10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Ann Oncol.* 2008;19:1423–9.
123. Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, et al. Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci.* 2008;99:995–9.
124. Toyama T, Yamashita H, Sugiura H, Kondo N, Iwase H, Fujii Y. No association between CYP2D6*10 genotype and survival of node-negative Japanese breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment. *Japanese J Clin Oncol.* 2009;39:651–6.
125. Welzen ME, Dezentje VO, van Schaik RH, Colbers AP, Guchelaar HJ, van Erp NP, et al. The Effect of Tamoxifen Dose Increment in Patients With Impaired CYP2D6 Activity. *Ther Drug Monit.* 2015;37:501-7.
126. Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, et al. Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;131:137–45.
127. Dezentje VO, Opdam FL, Gelderblom H, Hartigh den J, Van der Straaten T, Vree R, et al. CYP2D6 genotype- and endoxifen-guided tamoxifen dose escalation increases endoxifen serum concentrations without increasing side effects. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153:583–90.
128. Fox P, Balleine RL, Lee C, Gao B, Balakrishnar B, Menzies AM, et al. Dose Escalation of Tamoxifen in Patients with Low Endoxifen Level: Evidence for Therapeutic Drug Monitoring-The TADE Study. *Clin Cancer Res.* 2016;22:3164–71.

129. Martinez de Duenas E, Ochoa Aranda E, Blancas Lopez-Barajas I, Ferrer Magdalena T, Bandres Moya F, Chicharro Garcia LM, et al. Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Breast*. 2014;23:400–6.
130. Hertz DL, Deal A, Ibrahim JG, Walko CM, Weck KE, Anderson S, et al. Tamoxifen Dose Escalation in Patients With Diminished CYP2D6 Activity Normalizes Endoxifen Concentrations Without Increasing Toxicity. *Oncologist*. 2016;21:795–803.
131. Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics J*. 2000;10:187–216.
132. Dextromethorphan Pre-Review Report. Expert Committee on Drug Dependence Thirty-fifth Meeting Hammamet, Tunisia, 4-8 June 2012 [Available from: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/5.1Dextromethorphan_pre-review.pdf.
133. Ozdemir M, Crewe KH, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Assessment of in vivo CYP2D6 activity: differential sensitivity of commonly used probes to urine pH. *J Clin Pharmacol*. 2004;44:1398–404.
134. Chládek J, Zimová G, Beránek M, Martínková J. In-vivo indices of CYP2D6 activity: comparison of dextromethorphan metabolic ratios in 4-h urine and 3-h plasma. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56:651–7.
135. de Graan AJ, Teunissen SF, de Vos FY, Loos WJ, van Schaik RH, de Jongh FE, et al. Dextromethorphan as a phenotyping test to predict endoxifen exposure in patients on tamoxifen treatment. *J Clin Oncol*. 2011;29:3240–6.
136. Yeh GC, Tao PL, Ho HO, Lee YJ, Chen JY, Sheu MT. Analysis of pharmacokinetic parameters for assessment of dextromethorphan metabolic phenotypes. *J Biomed Sci*. 2003;10:552–64.
137. Gogtay NJ, Mali NB, Iyer K, Kadam PP, Sridharan K, Shrimal D, et al. Evaluation of cytochrome P450 2D6 phenotyping in healthy adult Western Indians. *Indian J Pharmacol*. 2014;46:266–9.
138. Bagheri A, Kamalidehghan B, Haghshenas M, Azadfar P, Akbari L, Sangtarash MH, et al. Prevalence of the CYP2D6*10 (C100T), *4 (G1846A), and *14 (G1758A) alleles among Iranians of different ethnicities. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:2627–34.
139. Modaresi-Nejad M, Shiva M, Afsharian P. Novel +90G>A Intronic Polymorphism of CYP2D6. *Cell J*. 2015;17:83–8.
140. UU NOMOR 13 TAHUN 1998 TENTANG KESEJAHTERAAN LANJUT USIA (Law No. 13 in 1998 on Elderly Welfare) [cited 2018 October 8]. Available from: <https://www.mindbank.info/item/5080>.

141. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 2004;363:157–63.
142. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*. 2010;6:195–7.
143. Lakhani SR EI, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ.(EDs.):. WHO Classification of Tumors of the Breast. IARC: Lyon; 2012.
144. Zung WW. A SELF-RATING DEPRESSION SCALE. *Arch Gen Psychiatry*. 1965;12:63–70.
145. Sloan JA, Loprinzi CL, Novotny PJ, Barton DL, Lavasseur BI, Windschitl H. Methodologic lessons learned from hot flash studies. *J Clin Oncol*. 2001;19:4280–90.
146. Helland T, Henne N, Bifulco E, Naume B, Borgen E, Kristensen VN, et al. Serum concentrations of active tamoxifen metabolites predict long-term survival in adjuvantly treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2017;19:125–38.
147. Binkhorst L, Mathijssen RH, Jager A, van Gelder T. Individualization of tamoxifen therapy: much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treat Rev*. 2015;41:289–99.
148. Stearns V, Rae JM. Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response? *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e34–51.
149. Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:61–74.
150. Wagner JG. Time to reach steady state and prediction of steady-state concentrations for drugs obeying Michaelis-Menten elimination kinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1978;6:209–25.
151. Woo HI, Lee SK, Kim J, Kim SW, Yu J, Bae SY, et al. Variations in plasma concentrations of tamoxifen metabolites and the effects of genetic polymorphisms on tamoxifen metabolism in Korean patients with breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8:100296–311.
152. Koh KH, Pan X, Shen HW, Arnold SL, Yu AM, Gonzalez FJ, et al. Altered expression of small heterodimer partner governs cytochrome P450 (CYP) 2D6 induction during pregnancy in CYP2D6-humanized mice. *J Biol Chem*. 2014;289:3105–13.
153. Pan X, Jeong H. Estrogen-Induced Cholestasis Leads to Repressed CYP2D6 Expression in CYP2D6-Humanized Mice. *Mol Pharmacol*. 2015;88:106–12.

154. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002;3:229–43.
155. Baclig MO, Predicala RZ, Mapua CA, Lozano-Kuhne JP, Daroy ML, Natividad FF, et al. Allelic and genotype frequencies of catechol-O-methyltransferase (Val158Met) and CYP2D6*10 (Pro34Ser) single nucleotide polymorphisms in the Philippines. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2012;3:115–21.
156. Lu J, Li H, Guo P, Shen R, Luo Y, Ge Q, et al. The effect of CYP2D6 *10 polymorphism on adjuvant tamoxifen in Asian breast cancer patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2017;10:5429–37.
157. Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M, et al. Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2010;28:1287–93.
158. Schroth W, Winter S, Muerdter T, Schaeffeler E, Eccles D, Eccles B, et al. Improved Prediction of Endoxifen Metabolism by CYP2D6 Genotype in Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. *Front Pharmacol*. 2017;8:582–90.
159. Antunes MV, de Oliveira V, Raymundo S, Staudt DE, Gossling G, Biazus JV, et al. CYP3A4*22 is related to increased plasma levels of 4-hydroxytamoxifen and partially compensates for reduced CYP2D6 activation of tamoxifen. *Pharmacogenomics*. 2015;16:601–17.
160. Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci*. 2011;100:3655–81.
161. Chanawong A, Hu DG, Meech R, Mackenzie PI, McKinnon RA. Induction of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene expression by the major active metabolites of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen, in breast cancer cells. *Drug Metab Dispos*. 2015;43:889–97.
162. Sutiman N, Lim JSL, Muerdter TE, Singh O, Cheung YB, Ng RCH, et al. Pharmacogenetics of UGT1A4, UGT2B7 and UGT2B15 and Their Influence on Tamoxifen Disposition in Asian Breast Cancer Patients. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55:1239–50.
163. Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK. A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res*. 2000;60:2836–9.
164. Goetz MP, Sun JX, Suman VJ, Silva GO, Perou CM, Nakamura Y, et al. Loss of heterozygosity at the CYP2D6 locus in breast cancer: implications for germline pharmacogenetic studies. *J Natl Cancer Inst*. 2014;107:1–8.
165. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103:770–7.

166. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L, et al. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005;65:11071–82.
167. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14:811–6.
168. Jurica J, Bartecek R, Zourkova A, Pindurova E, Sulcova A, Kasperek T, et al. Serum dextromethorphan/dextrorphan metabolic ratio for CYP2D6 phenotyping in clinical practice. *J Clin Pharm Ther.* 2012;37:486–90.
169. Borges S, Li L, Hamman MA, Jones DR, Hall SD, Gorski JC. Dextromethorphan to dextrorphan urinary metabolic ratio does not reflect dextromethorphan oral clearance. *Drug Metab Dispos.* 2005;33:1052–5.
170. Pfaff G, Briegel P, Lamprecht I. Inter-individual variation in the metabolism of dextromethorphan. *Int J Pharm.* 1983;14:173–89.
171. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Grassi JM, Granda BW, Venkatakrishnan K, Schmider J, et al. Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of dextromethorphan in-vitro: role of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A. *J Pharm Pharmacol.* 1998;50:997–1004.
172. Streetman DS, Ellis RE, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Gotschall R, et al. Dose dependency of dextromethorphan for cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) phenotyping. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;66:535–41.
173. Kohler D, Hartter S, Fuchs K, Sieghart W, Hiemke C. CYP2D6 genotype and phenotyping by determination of dextromethorphan and metabolites in serum of healthy controls and of patients under psychotropic medication. *Pharmacogenetics.* 1997;7:453–61.
174. Shiran MR, Chowdry J, Rostami-Hodjegan A, Ellis SW, Lennard MS, Iqbal MZ, et al. A discordance between cytochrome P450 2D6 genotype and phenotype in patients undergoing methadone maintenance treatment. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56:220–4.
175. Funck-Brentano C, Boelle PY, Verstuyft C, Bornert C, Becquemont L, Poirier JM. Measurement of CYP2D6 and CYP3A4 activity in vivo with dextromethorphan: sources of variability and predictors of adverse effects in 419 healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61:821–9.
176. Mortimer O, Lindstrom B, Laurell H, Bergman U, Rane A. Dextromethorphan: polymorphic serum pattern of the O-demethylated and didemethylated metabolites in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;27:223–7.
177. Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, Rzemislawska Z, Jazwinska-Tarnawska E, Milejski P, et al. CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002;58:533–5.

178. Leong SP, Shen ZZ, Liu TJ, Agarwal G, Tajima T, Paik NS, et al. Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? *World J Surg.* 2010;34:2308–24.
179. Prevention CfDCa. U.S. Cancer Statistics Working Group. U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool, based on November 2017 submission data (1999-2015): U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute; [Available from: <https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/DataViz.html>].
180. John V, Mashru S, Lichtman S. Pharmacological factors influencing anticancer drug selection in the elderly. *Drugs & aging.* 2003;20:737–59.
181. Rock CL, Doyle C, Demark-Wahnefried W, Meyerhardt J, Courneya KS, Schwartz AL, et al. Nutrition and physical activity guidelines for cancer survivors. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:243–74.
182. Park S, Han W, Kim J, Kim MK, Lee E, Yoo TK, et al. Risk Factors Associated with Distant Metastasis and Survival Outcomes in Breast Cancer Patients with Locoregional Recurrence. *J Breast Cancer.* 2015;18:160–6.
183. Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J Am Coll Surg.* 2009;208:341–7.
184. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One.* 2009;4:e7695–704.
185. Lien EA, Anker G, Ueland PM. Pharmacokinetics of tamoxifen in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;55:229–31.
186. Jordan VC, Fritz NF, Langan-Fahey S, Thompson M, Tormey DC. Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:1488–91.
187. Lum SS, Woltering EA, Fletcher WS, Pommier RF. Changes in serum estrogen levels in women during tamoxifen therapy. *Am J Surg.* 1997;173:399–402.
188. Margolin S, Lindh JD, Thoren L, Xie H, Koukel L, Dahl ML, et al. CYP2D6 and adjuvant tamoxifen: possible differences of outcome in pre- and postmenopausal patients. *Pharmacogenomics.* 2013;14:613–22.
189. Sim S, Lovrot J, Lindh JD, Bergh J, Xie H. Effect of CYP2C19 and CYP2D6 genotype on tamoxifen treatment outcome indicates endogenous and exogenous interplay. *Pharmacogenomics.* 2018;19:1027–37.
190. Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT. Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively

- expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*. 2003;144:3382–98.
191. Meltzer NM, Stang P, Sternson LA, Wade AE. Influence of tamoxifen and its N-desmethyl and 4-hydroxy metabolites on rat liver microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol*. 1984;33:115–23.
 192. Baraldo M. The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4:175–92.
 193. Ohno M, Yamaguchi I, Ito T, Saiki K, Yamamoto I, Azuma J. Circadian variation of the urinary 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratio that would reflect hepatic CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;55:861–5.
 194. Aryandono T, Harijadi, Ghozali A. Correlation of clinical, pathological status, hormone receptor and C-erbB-2 oncoprotein in breast cancer patients. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27 600–6.
 195. Ambrose M, Ghosh M, Mallikarjuna VS, Kurian A. Immunohistochemical profile of breast cancer patients at a tertiary care hospital in South India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12:625–9.
 196. Ernst MF, Roukema JA, Coebergh JW, Repelaer van Driel OJ, van Beek MW, van der Sangen MJ, et al. Breast cancers found by screening: earlier detection, lower malignant potential or both? *Breast Cancer Res Treat*. 2002;76:19–25.
 197. Nagtegaal ID, Duffy SW. Reduction in rate of node metastases with breast screening: consistency of association with tumor size. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137:653–63.
 198. Duffy SW, Tabar L, Vitak B, Warwick J. Tumor size and breast cancer detection: what might be the effect of a less sensitive screening tool than mammography? *Breast J*. 2006;12:S91–5.
 199. Setyawati Y, Rahmawati Y, Widodo I, Ghozali A, Purnomosari D. The Association between Molecular Subtypes of Breast Cancer with Histological Grade and Lymph Node Metastases in Indonesian Woman. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19:1263–8.
 200. Widodo I, Dwianingsih EK, Triningsih E, Utoro T, Soeripto S. Clinicopathological Features of Indonesian Breast Cancers with Different Molecular Subtypes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:6109–13.
 201. Chuthapisith S, Permsapaya W, Warnnissorn M, Akewanlop C, Sirivatanauksorn V, Osoth PP. Breast Cancer Subtypes Identified by the ER, PR and HER-2 Status in Thai Women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:459–62.
 202. Devi CR, Tang TS, Corbex M. Incidence and risk factors for breast cancer subtypes in three distinct South-East Asian ethnic groups: Chinese, Malay and natives of Sarawak, Malaysia. *Int J Cancer*. 2012;131:2869–77.

203. Lin CH, Liao JY, Lu YS, Huang CS, Lee WC, Kuo KT, et al. Molecular subtypes of breast cancer emerging in young women in Taiwan: evidence for more than just westernization as a reason for the disease in Asia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:1807–14.
204. San TH, Fujisawa M, Fushimi S, Soe L, Min NW, Yoshimura T, et al. Molecular Subtypes of Breast Cancers from Myanmar Women: A Study of 91 Cases at Two Pathology Centers. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18:1617–21.
205. Lambertini M, Santoro L, Del Mastro L, Nguyen B, Livraghi L, Ugolini D, et al. Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Treat Rev.* 2016;49:65–76.
206. Parise CA, Bauer KR, Caggiano V. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;76:44–52.
207. McConn DJ, 2nd, Lin YS, Mathisen TL, Blough DK, Xu Y, Hashizume T, et al. Reduced duodenal cytochrome P450 3A protein expression and catalytic activity in patients with cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85:387–93.
208. Yang LQ, Li SJ, Cao YF, Man XB, Yu WF, Wang HY, et al. Different alterations of cytochrome P450 3A4 isoform and its gene expression in livers of patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2003;9:359–63.
209. Moreira PI, Custodio JB, Nunes E, Moreno A, Seica R, Oliveira CR, et al. Estradiol affects liver mitochondrial function in ovariectomized and tamoxifen-treated ovariectomized female rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;221:102–10.
210. Carthew P, Martin EA, White IN, De Matteis F, Edwards RE, Dorman BM, et al. Tamoxifen induces short-term cumulative DNA damage and liver tumors in rats: promotion by phenobarbital. *Cancer Res.* 1995;55:544–7.
211. White IN, de Matteis F, Davies A, Smith LL, Crofton-Sleigh C, Venitt S, et al. Genotoxic potential of tamoxifen and analogues in female Fischer F344/n rats, DBA/2 and C57BL/6 mice and in human MCL-5 cells. *Carcinogenesis.* 1992;13:2197–203.
212. Gao FF, Lv JW, Wang Y, Fan R, Li Q, Zhang Z, et al. Tamoxifen induces hepatotoxicity and changes to hepatocyte morphology at the early stage of endocrinotherapy in mice. *Biomed Rep.* 2016;4:102–6.
213. Larosche I, Letteron P, Fromenty B, Vadrot N, Abbey-Toby A, Feldmann G, et al. Tamoxifen inhibits topoisomerases, depletes mitochondrial DNA, and triggers steatosis in mouse liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321:526–35.
214. Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22:335–53.
215. Ribeiro MP, Santos AE, Custodio JB. Mitochondria: the gateway for tamoxifen-induced liver injury. *Toxicology.* 2014;323:10–8.

216. Ribeiro MP, Silva FS, Santos AE, Santos MS, Custodio JB. The antiestrogen endoxifen protects rat liver mitochondria from permeability transition pore opening and oxidative stress at concentrations that do not affect the phosphorylation efficiency. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;267:104–12.
217. Larrey D, Babany G, Tinel M, Freneaux E, Amouyal G, Habersetzer F, et al. Effect of liver disease on dextromethorphan oxidation capacity and phenotype: a study in 107 patients. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;28:297–304.
218. Wong VW, Chan WK, Chitturi S, Chawla Y, Dan YY, Duseja A, et al. Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017-Part 1: Definition, risk factors and assessment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018;33:70–85.
219. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology.* 2009;137:865–72.
220. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138:863–70.
221. Chow JD, Jones ME, Prella K, Simpson ER, Boon WC. A selective estrogen receptor alpha agonist ameliorates hepatic steatosis in the male aromatase knockout mouse. *J Endocrinol.* 2011;210:323–34.
222. Yang YJ, Kim KM, An JH, Lee DB, Shim JH, Lim YS, et al. Clinical significance of fatty liver disease induced by tamoxifen and toremifene in breast cancer patients. *Breast.* 2016;28:67–72.
223. Liu CL, Huang JK, Cheng SP, Chang YC, Lee JJ, Liu TP. Fatty liver and transaminase changes with adjuvant tamoxifen therapy. *Anticancer Drugs.* 2006;17:709–13.
224. Saphner T, Triest-Robertson S, Li H, Holzman P. The association of nonalcoholic steatohepatitis and tamoxifen in patients with breast cancer. *Cancer.* 2009;115:3189–95.
225. Zhao F, Xie P, Jiang J, Zhang L, An W, Zhan Y. The effect and mechanism of tamoxifen-induced hepatocyte steatosis in vitro. *Int J Mol Sci.* 2014;15:4019–30.
226. Lee MH, Kim JW, Kim JH, Kang KS, Kong G, Lee MO. Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen. *Toxicol Lett.* 2010;199:416–24.
227. Miyashita T, Toyoda Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Hepatoprotective effect of tamoxifen on steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in mouse models. *The Journal of toxicological sciences.* 2012;37:931–42.

228. Liu CL, Yang TL. Sequential changes in serum triglyceride levels during adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients and the effect of dose reduction. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;79:11–6.
229. Bruno S, Maisonneuve P, Castellana P, Rotmensz N, Rossi S, Maggioni M, et al. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis: prospective study of 5408 women enrolled in Italian tamoxifen chemoprevention trial. *BMJ.* 2005;330:932–8.
230. Molleston JP, Schwimmer JB, Yates KP, Murray KF, Cummings OW, Lavine JE, et al. Histological abnormalities in children with nonalcoholic fatty liver disease and normal or mildly elevated alanine aminotransferase levels. *J Pediatr.* 2014;164:707-13.e3.
231. Ahmad A, Shahabuddin S, Sheikh S, Kale P, Krishnappa M, Rane RC, et al. Endoxifen, a new cornerstone of breast cancer therapy: demonstration of safety, tolerability, and systemic bioavailability in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88:814–7.
232. Helsby NA, Hui CY, Goldthorpe MA, Coller JK, Soh MC, Gow PJ, et al. The combined impact of CYP2C19 and CYP2B6 pharmacogenetics on cyclophosphamide bioactivation. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;70:844–53.
233. Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer.* 2002;97:129–32.
234. Hsieh KP, Chen LC, Cheung KL, Chang CS, Yang YH. Interruption and non-adherence to long-term adjuvant hormone therapy is associated with adverse survival outcome of breast cancer women--an Asian population-based study. *PLoS One.* 2014;9:e87027–35.
235. Cluze C, Rey D, Huiart L, BenDiane MK, Bouhnik AD, Berenger C, et al. Adjuvant endocrine therapy with tamoxifen in young women with breast cancer: determinants of interruptions vary over time. *Ann Oncol.* 2012;23:882–90.
236. Gao P, You L, Wu D, Shi A, Miao Q, Rana U, et al. Adherence to endocrine therapy among Chinese patients with breast cancer: current status and recommendations for improvement. *Patient Prefer Adherence.* 2018;12:887–97.
237. Marcath LA, Deal AM, Van Wieren E, Danko W, Walko CM, Ibrahim JG, et al. Comprehensive assessment of cytochromes P450 and transporter genetics with endoxifen concentration during tamoxifen treatment. *Pharmacogenet Genomics.* 2017;27:402–9.
238. Thummel KE, Brimer C, Yasuda K, Thottassery J, Senn T, Lin Y, et al. Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3. *Mol Pharmacol.* 2001;60:1399–406.

239. Thirumaran RK, Lamba JK, Kim RB, Urquhart BL, Gregor JC, Chande N, et al. Intestinal CYP3A4 and midazolam disposition in vivo associate with VDR polymorphisms and show seasonal variation. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:104–12.
240. Setiati S, Oemardi M, Sutrisna B, Supartono. The role of ultraviolet-B from sun exposure on vitamin D3 and parathyroid hormone level in elderly women in Indonesia. *Asian J Gerontol Geriatr.* 2007;2:126–32.
241. Green TJ, Skeaff CM, Rockell JE, Venn BJ, Lambert A, Todd J, et al. Vitamin D status and its association with parathyroid hormone concentrations in women of child-bearing age living in Jakarta and Kuala Lumpur. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:373–8.
242. Wacker M, Holick MD-e-. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol.* 2013;5:51–108.
243. Powers JL, Buys SS, Fletcher D, Melis R, Johnson-Davis KL, Lyon E, et al. Multigene and drug interaction approach for tamoxifen metabolite patterns reveals possible involvement of CYP2C9, CYP2C19, and ABCB1. *J Clin Pharmacol.* 2016;56:1570–81.
244. Kiyotani K, Mushiroda T, Nakamura Y, Zembutsu H. Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27:122–31.
245. Sridar C, Kent UM, Notley LM, Gillam EM, Hollenberg PF. Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301:945–52.
246. Henderson SL, Teft WA, Kim RB. Profound reduction in tamoxifen active metabolite endoxifen in a breast cancer patient treated with rifampin prior to initiation of an anti-TNFalpha biologic for ulcerative colitis: a case report. *BMC Cancer.* 2016;16:304–9.
247. Scheer N, Kapelyukh Y, Rode A, Oswald S, Busch D, McLaughlin LA, et al. Defining Human Pathways of Drug Metabolism In Vivo through the Development of a Multiple Humanized Mouse Model. *Drug Metab Dispos.* 2015;43:1679–90.
248. He ZX, Chen XW, Zhou ZW, Zhou SF. Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. *Drug Metab Rev.* 2015;47:470–519.
249. Teft WA, Mansell SE, Kim RB. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance). *Drug Metab Dispos.* 2011;39:558–62.
250. Teh LK, Mohamed NI, Salleh MZ, Rohaizak M, Shahrin NS, Saladina JJ, et al. The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *AAPS J.* 2012;14:52–9.

251. Sensorn I, Sukasem C, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pasomsub E, Trachu N, et al. ABCB1 and ABCC2 and the risk of distant metastasis in Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Onco Targets Ther.* 2016;9:2121–9.
252. Hansten PD. The Underrated Risks of Tamoxifen Drug Interactions. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018;43:495–508.
253. Sproule BA, Otton SV, Cheung SW, Zhong XH, Romach MK, Sellers EM. CYP2D6 inhibition in patients treated with sertraline. *J Clin Psychopharmacol.* 1997;17:102–6.
254. Binkhorst L, Bannink M, de Bruijn P, Ruit J, Droogendijk H, van Alphen RJ, et al. Augmentation of Endoxifen Exposure in Tamoxifen-Treated Women Following SSRI Switch. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55:249–55.
255. Cronin-Fenton D, Lash TL, Sorensen HT. Selective serotonin reuptake inhibitors and adjuvant tamoxifen therapy: risk of breast cancer recurrence and mortality. *Future Oncol.* 2010;6:877–80.
256. Busby J, Mills K, Zhang SD, Liberante FG, Cardwell CR. Selective serotonin reuptake inhibitor use and breast cancer survival: a population-based cohort study. *Breast Cancer Res.* 2018;20:4–14.
257. Chubak J, Bowles EJ, Yu O, Buist DS, Fujii M, Boudreau DM. Breast cancer recurrence in relation to antidepressant use. *Cancer Causes Control.* 2016;27:125–36.
258. Haque R, Shi J, Schottinger JE, Ahmed SA, Cheetham TC, Chung J, et al. Tamoxifen and Antidepressant Drug Interaction in a Cohort of 16,887 Breast Cancer Survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108–15.
259. Valachis A, Garmo H, Weinman J, Fredriksson I, Ahlgren J, Sund M, et al. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors use on endocrine therapy adherence and breast cancer mortality: a population-based study. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;159:293–303.
260. Donneyong MM, Bykov K, Bosco-Levy P, Dong YH, Levin R, Gagne JJ. Risk of mortality with concomitant use of tamoxifen and selective serotonin reuptake inhibitors: multi-database cohort study. *BMJ.* 2016;354:i5014–21.
261. Cronin-Fenton DP, Damkier P. Tamoxifen and CYP2D6: A Controversy in Pharmacogenetics. *Adv Pharmacol.* 2018;83:65–91.
262. Cotreau MM, von Moltke LL, Harmatz JS, Greenblatt DJ. Molecular and pharmacokinetic evaluation of rat hepatic and gastrointestinal cytochrome p450 induction by tamoxifen. *Pharmacology.* 2001;63:210–9.
263. Zhao XJ, Jones DR, Wang YH, Grimm SW, Hall SD. Reversible and irreversible inhibition of CYP3A enzymes by tamoxifen and metabolites. *Xenobiotica.* 2002;32:863–78.

264. Baxter SD, Teft WA, Choi YH, Winquist E, Kim RB. Tamoxifen-associated hot flash severity is inversely correlated with endoxifen concentration and CYP3A4*22. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145:419–28.
265. Andrikoula M, Prelevic G. Menopausal hot flushes revisited. *Climacteric.* 2009;12:3–15.
266. Henry NL, Rae JM, Li L, Azzouz F, Skaar TC, Desta Z, et al. Association between CYP2D6 genotype and tamoxifen-induced hot flashes in a prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117:571–5.
267. Bonanni B, Macis D, Maisonneuve P, Johansson HA, Gucciardo G, Oliviero P, et al. Polymorphism in the CYP2D6 tamoxifen-metabolizing gene influences clinical effect but not hot flashes: data from the Italian Tamoxifen Trial. *J Clin Oncol.* 2006;24:3708–9.
268. Jansen LE, Teft WA, Rose RV, Lizotte DJ, Kim RB. CYP2D6 genotype and endoxifen plasma concentration do not predict hot flash severity during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;171:701–70.
269. Moon Z, Hunter MS, Moss-Morris R, Hughes LD. Factors related to the experience of menopausal symptoms in women prescribed tamoxifen. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 2017;38:226–35.
270. Zivian MT. Side effects of aromatase inhibitors versus tamoxifen: the patients' perspective. *Breast Diseases A Year Book Quarterly* 18;192:201–2.
271. Yang Y, Pan W, Tang X, Wu S, Sun X. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing the efficacy and safety of anastrozole versus tamoxifen for breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8:48362–74.
272. Ishizuka M, Hatori M, Suzuki T, Miki Y, Darnel AD, Tazawa C, et al. Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clin Sci* 2004;106:293–300.
273. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266–81.
274. Shi L, Nechuta S, Gao YT, Zheng Y, Dorjgochoo T, Wu J, et al. Correlates of 25-hydroxyvitamin D among Chinese breast cancer patients. *PLoS One.* 2014;9:e86467–74.
275. Khan QJ, Reddy PS, Kimler BF, Sharma P, Baxa SE, O'Dea AP, et al. Effect of vitamin D supplementation on serum 25-hydroxy vitamin D levels, joint pain, and fatigue in women starting adjuvant letrozole treatment for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119:111–8.
276. Rastelli AL, Taylor ME, Gao F, Armamento-Villareal R, Jamalabadi-Majidi S, Napoli N, et al. Vitamin D and aromatase inhibitor-induced musculoskeletal symptoms (AIMSS): a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129:107–16.
277. Prieto-Alhambra D, Javaid MK, Servitja S, Arden NK, Martinez-Garcia M, Diez-Perez A, et al. Vitamin D threshold to prevent aromatase inhibitor-induced arthralgia: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:869–78.

278. Kim HJ, Koh BS, Yu JH, Lee JW, Son BH, Kim SB, et al. Changes in serum hydroxyvitamin D levels of breast cancer patients during tamoxifen treatment or chemotherapy in premenopausal breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 2014;50:1403–11.
279. Khalil R, Kim NR, Jardi F, Vanderschueren D, Claessens F, Decallonne B. Sex steroids and the kidney: role in renal calcium and phosphate handling. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;465:61–72.
280. Escalera MT, Sonohara S, Brentani MM. Sex steroids induced up-regulation of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ receptors in T 47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993;45:257–63.
281. Gingery A, Subramaniam M, Pitel KS, Reese JM, Cicek M, Lindenmaier LB, et al. The effects of a novel hormonal breast cancer therapy, endoxifen, on the mouse skeleton. *PLoS One*. 2014;9:e98219–31.
282. Gingery A, Iwaniec UT, Subramaniam M, Turner RT, Pitel KS, McGovern RM, et al. Skeletal and Uterotrophic Effects of Endoxifen in Female Rats. *Endocrinology*. 2017;158:3354–68.
283. Grossmann M, Ramchand SK, Milat F, Vincent A, Lim E, Kotowicz MA, et al. Assessment and management of bone health in women with oestrogen receptor-positive breast cancer receiving endocrine therapy: Position statement of the Endocrine Society of Australia, the Australian and New Zealand Bone & Mineral Society, the Australasian Menopause Society and the Clinical Oncology Society of Australia. *Clin Endocrinol*. 2018;89:280–96.
284. Martinkovich S, Shah D, Planey SL, Arnott JA. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1437–52.
285. Garuti G, Cellani F, Centinaio G, Sita G, Nalli G, Luerti M. Histopathologic behavior of endometrial hyperplasia during tamoxifen therapy for breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;101:269–73.
286. Schweikart KM, Eldridge SR, Safgren SL, Parman T, Reid JM, Ames MM, et al. Comparative uterotrophic effects of endoxifen and tamoxifen in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol*. 2014;42:1188–96.
287. Ismail SM. Pathology of endometrium treated with tamoxifen. *J Clin Pathol*. 1994;47:827–33.
288. Swerdlow AJ, Jones ME. Tamoxifen treatment for breast cancer and risk of endometrial cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:375–84.
289. Fleming CA, Heneghan HM, O'Brien D, McCartan DP, McDermott EW, Prichard RS. Meta-analysis of the cumulative risk of endometrial malignancy and systematic review of endometrial surveillance in extended tamoxifen therapy. *Br J Surg*. 2018;105:1098–106.
290. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years

- after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381:805–16.
291. Vosse M, Renard F, Coibion M, Neven P, Nogaret JM, Hertens D. Endometrial disorders in 406 breast cancer patients on tamoxifen: the case for less intensive monitoring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;101:58–63.
 292. Dieudonne AS, Lambrechts D, Smeets D, Belmans A, Wildiers H, Paridaens R, et al. The rs1800716 variant in CYP2D6 is associated with an increased double endometrial thickness in postmenopausal women on tamoxifen. *Ann Oncol*. 2014;25:90–5.
 293. Committee Opinion No. 601: Tamoxifen and uterine cancer. *Obstet Gynecol*. 2014;123:1394–7.
 294. Krebber AM, Buffart LM, Kleijn G, Riepma IC, de Bree R, Leemans CR, et al. Prevalence of depression in cancer patients: a meta-analysis of diagnostic interviews and self-report instruments. *Psychooncology*. 2014;23:121–30.
 295. Karakoyun-Celik O, Gorken I, Sahin S, Orcin E, Alanyali H, Kinay M. Depression and anxiety levels in woman under follow-up for breast cancer: relationship to coping with cancer and quality of life. *Med Oncol*. 2010;27:108–13.
 296. Chen X, Zheng Y, Zheng W, Gu K, Chen Z, Lu W, et al. Prevalence of depression and its related factors among Chinese women with breast cancer. *Acta Oncol*. 2009;48:1128–36.
 297. Zainal NZ, Nik-Jaafar NR, Baharudin A, Sabki ZA, Ng CG. Prevalence of Depression in Breast Cancer Survivors: a Systematic Review of Observational Studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:2649–56.
 298. Bethea CL, Lu NZ, Gundlach C, Streicher JM. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front Neuroendocrinol*. 2002;23:41–100.
 299. Del Rio JP, Alliende MI, Molina N, Serrano FG, Molina S, Vigil P. Steroid Hormones and Their Action in Women's Brains: The Importance of Hormonal Balance. *Front Public Health*. 2018;6:141–56.
 300. Thompson DS, Spanier CA, Vogel VG. The Relationship Between Tamoxifen, Estrogen, and Depressive Symptoms. *Breast J*. 1999;5:375–82.
 301. Breuer B, Anderson R. The relationship of tamoxifen with dementia, depression, and dependence in activities of daily living in elderly nursing home residents. *Women Health*. 2000;31:71–85.
 302. Kornreich C, Dan B, Vandriette Y. Suicidal risk in a patient receiving tamoxifen treatment for breast cancer. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2010;12:1–2.
 303. Lee KC, Ray GT, Hunkeler EM, Finley PR. Tamoxifen treatment and new-onset depression in breast cancer patients. *Psychosomatics*. 2007;48:205–10.

304. Day R, Ganz PA, Costantino JP. Tamoxifen and depression: more evidence from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project's Breast Cancer Prevention (P-1) Randomized Study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1615–23.
305. Azizi-Malekabadi H, Pourganji M, Zabihi H, Saeedjalali M, Hosseini M. Tamoxifen antagonizes the effects of ovarian hormones to induce anxiety and depression-like behavior in rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73:132–9.
306. Calmarza-Font I, Lagunas N, Garcia-Segura LM. Antidepressive and anxiolytic activity of selective estrogen receptor modulators in ovariectomized mice submitted to chronic unpredictable stress. *Behav Brain Res.* 2012;227:287–90.
307. Li M, Kennedy EB, Byrne N, Gérin-Lajoie C, Katz MR, Keshavarz H, et al. Management of Depression in Patients With Cancer: A Clinical Practice Guideline. *J Oncol Pract.* 2016;12:747–56.

Lampiran 1. Surat Persetujuan Komisi Etik FK. Universitas Indonesia



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1356
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373;
3922977, 3927360, 3153236
F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

Nomor : 617 /UN2.F1/ETIK/2017

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Genotip dan Fenotip CYP2D6 sebagai Prediktor Kadar Z-Endoksifen pada Penderita Kanker Payudara yang diterapi Tamoksifen".

No. protokol: 17-06-0613

Peneliti Utama : dr. Yenny, SpFK
Principal Investigator

Nama Institusi : Ilmu Kedokteran FKUI
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approves the above mentioned protocol



05 JUL 2017

Ketua
Chairman

[Signature]

Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

* *Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.*

** *Peneliti berkewajiban:*

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh *informed consent* dari subyek penelitian.
5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai.
6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KEPK FKUI-RSCM.

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.

All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 2. Surat Persetujuan Komite Etik RS.Kanker Dharmais



KEMENTERIAN KESEHATAN RI
DIREKTORAT JENDERAL PELAYANAN KESEHATAN
RUMAH SAKIT KANKER "DHARMAIS"
 Jl. Let. Jend. S. Parman Kav. 84 - 86, Slipi, Jakarta Barat 11420
 Telepon : (021) - 5681570 Faksimile : (021) - 5681579



No. : 054/KEPK/VIII/2017

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL CLEARANCE

Panitia Etik Penelitian, Rumah Sakit Kanker "Dharmas" dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The committee of the Medical Research Ethics of the "Dharmas" Cancer Hospital, with regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the protocol entitled :

"Genotip dan Fenotip CYP2D6 sebagai Prediktor Kadar Z-Endoksifen pada Penderita Kanker Payudaryang diterapi Tamoksifen "

Nama Peneliti Utama : dr. Yenny, SpFK
Name of the Principal Investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Name of Institution

Dan telah menyetujui perpanjangan proposal tersebut di atas.
And approved the protocol

Jakarta, 10 Agustus 2017

Ketua
Chairman

Dr.dr. Noorwati Sutandyo, SpPD-KHOM

*Lolos Kaji Etik (*Ethical approval*) berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan ini dikeluarkan

**Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila:
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*
5. Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) akan melakukan pemantauan kegiatan penelitian dengan pemberitahuan terlebih dahulu kepada tim peneliti

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP

All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure

Professional, Care, Continuous Improvement & Synergy
 Home page: www.dharmas.co.id Email: dharmas@dharmas.co.id





KEMENTERIAN KESEHATAN RI
DIREKTORAT JENDERAL PELAYANAN KESEHATAN
RUMAH SAKIT KANKER "DHARMAIS"
 Jl. Let. Jend. S. Parman Kav. 84 - 86, Slipi, Jakarta Barat 11420
 Telepon : (021) 5681570 Faximile : (021) 5681579



Nomor : LB.02.01/XXII.2/ 7949/2017
 Hal : Ijin Penelitian

7 Juli 2017

Kepada Yth:
 Ketua Program Studi S3 Ilmu Kesehatan Kedokteran
 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
 Jakarta

Menjawab surat Saudara , No. 741/UN2.F1.D/S3IK/PDP.01/2017 Mengenai Permohonan ijin Penelitian, maka dengan ini kami beritahukan bahwa kami dapat menyetujui dan memberikan ijin untuk melakukan kegiatan tersebut di Rumah Sakit Kanker "Dharmas" kepada Mahasiswa/wi saudara :

Nama : dr.Yenny, Sp.FK
 NPM : 1506818032
 Judul : "Genotip dan Fenotip CYP2D6 sebagai Predoktor Kadar Z-Endoksifen pada Penderita Kanker Payudara yang Diterapi Tamoksifen"

Untuk kelancaran pengumpulan data, kami telah menunjuk Pembimbing /Narasumber di Rumah Sakit Kanker "Dharmas" :

Nama : Dr.dr. Denni Joko P.SpB(K),Onk

Selanjutnya perlu kami informasikan bahwa, sesuai dengan ketentuan yang berlaku di RS Kanker "Dharmas", dan akan dikenakan biaya pada mahasiswa yang bersangkutan sebagai berikut :

1. Biaya Narasumber/Pembimbing = Rp. 1.000.000,-
2. Biaya Institusi Rumah Sakit = Rp. 2.000.000,-
- = Rp. 3.000.000,-

(tiga juta rupiah)

Kami beritahukan pula untuk biaya pemakaian alat dan biaya habis pakai di perhitungan setelah penelitian selesai. Biaya tersebut agar dibayarkan kepada RS.Kanker Dharmas c.q. Bendahara Penerima Intern RS. Kanker "Dharmas" via Bank Mandiri dengan **N0.Rek. 116.00000.6028.6** Sebelum melaksanakan kegiatan kami mohon agar yang bersangkutan terlebih dahulu menghubungi Bagian Penelitian dan Pengembangan RS.Kanker "Dharmas".

Demikian atas perhatiannya kami ucapkan terimakasih.-

Direksi RS Kanker "Dharmas"
 Direktur Utama

Prof.dr.Abdul Kadir,PhD.Sp.THT-KL(K),MARS
 NIP:196205231989031001

Tembusan Kepada Yth :
 1.Dr.dr. Denni Joko P.SpB(K),Onk

FORMULIR IDENTITAS SUBJEK TAMOKSIFEN

Hari/Tanggal :

[illegible]

Lampiran 5. Formulir Informasi untuk Subjek Studi

Formulir Informasi untuk Subjek Studi (*informed consent*)**INFORMASI UNTUK CALON SUBJEK**

Kami, Tim peneliti dari Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, dan RS.Kanker Dharmais, Jakarta, akan melakukan penelitian untuk mengetahui kemanjuran obat antikanker tamoksifen pada penderita KPD.

KPD merupakan penyebab kematian tersering pada penderita kanker di dunia termasuk di Indonesia. Tamoksifen merupakan obat antikanker yang dipakai selama ini untuk mengobati KPD dengan reseptor hormon positif, namun penggunaan tamoksifen masih banyak penderita KPD yang mengalami kekambuhan selama terapi.

Ada banyak faktor yang dapat menyebabkan terjadinya kekambuhan antara lain kadar Z-endoksifen (metabolit tamoksifen) dalam darah. Hingga saat ini belum diketahui apakah kadar Z-endoksifen penderita KPD di Indonesia sudah mencapai kadar minimal yang dibutuhkan untuk keberhasilan terapi. Selain itu diketahui ada banyak faktor yang dapat mempengaruhi kadar Z-endoksifen antara lain adanya perbedaan genetik enzim pemetabolisme dan fenotip (aktivitas enzim pemetabolisme) yang aktivitasnya bervariasi antar individu dan etnik, dosis tamoksifen yang tidak adekuat, kepatuhan minum obat, interaksi obat, dan lain-lain. Oleh karena itu kami tertarik untuk meneliti apakah kadar Z-endoksifen pada populasi Indonesia sudah mencapai kadar minimal yang diinginkan untuk keberhasilan terapi dan meneliti faktor-faktor yang mempengaruhi kadar Z-endoksifen dalam darah. Anda kami undang untuk ikut dalam penelitian ini karena menderita KPD.

Untuk itulah kami mengundang partisipasi Anda dalam penelitian ini. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi masukan untuk membuat panduan dalam penyesuaian dosis tamoksifen pada penderita KPD yang memperoleh obat antikanker di Indonesia.

Bila Anda bersedia ikut dalam penelitian ini, Anda diminta menandatangani surat persetujuan dan selanjutnya mengikuti prosedur penelitian ini. Anda diminta minum 1 tablet tamoksifen (20 mg) 1 hari sebelum studi dimulai (pada waktu biasa minum obat) dan datang ke lokasi penelitian pada waktu yang telah disepakati sebelumnya dalam kondisi puasa (tidak sarapan dulu).

Pada saat kunjungan Anda akan diwawancarai dan dilakukan pengukuran berat badan, tinggi badan, indeks massa tubuh, lingkar pinggang, lingkar perut, rasio lingkar pinggang/lingkar perut dan dilakukan pencatatan. Setelah pengukuran selesai Anda diminta untuk minum 2/3 sendok makan (10 mL) obat batuk (DMP 30 mg) yang diminum dengan segelas air putih ($\pm$ 200 mL) untuk melihat aktivitas enzim hati yang memetabolisme obat tamoksifen. Dua jam setelah minum obat maka Anda diperkenankan untuk sarapan dengan makanan yang disiapkan oleh peneliti. Pada 3 jam setelah minum obat, akan dilakukan pengambilan darah dari pembuluh darah di lengan Anda dengan menggunakan jarum suntik. Total pengambilan darah sebanyak 1 kali sebanyak 15 mL ($\pm$ 1 sendok makan), yang akan dipergunakan untuk pemeriksaan kadar Z-END, MR DMP/DX (9mL), gen pemetabolisme tamoksifen CYP2D6 (3 mL), dan fungsi hati (3 mL) di mana jumlah ini tidak membahayakan kesehatan Anda. Pengambilan darah biasanya menimbulkan rasa nyeri yang ringan, dan terkadang bisa terjadi infeksi. Namun, untuk mencegah terjadinya infeksi sebelum dan sesudah pengambilan darah akan selalu dilakukan pembersihan dengan alkohol 70%. Bila terjadi infeksi dokter akan memberikan antibiotik yang diperlukan secara cuma-cuma. Kadang-kadang di sekitar tempat tusukan jarum akan timbul memar atau kulit yang berwarna biru, hal ini tidak berbahaya dan biasanya sembuh sendiri dalam 4–7 hari.

Anda akan mendapatkan obat, pemeriksaan laboratorium, dan layanan pengawasan dokter secara cuma-cuma. Selain itu Anda akan mendapat penggantian uang transport sebesar Rp 80.000/hari dan makan siang diberikan jika pengambilan darah berlangsung sampai siang.

Semua data kesehatan sebelum dan sesudah penelitian yang Anda berikan atau didapatkan melalui pemeriksaan, akan dijaga kerahasiaannya. Selain dari tim

peneliti dan Komite Etik Penelitian FKUI dan RS.Kanker Dharmais, tidak ada pihak lain yang dapat mengetahui identitas Anda.

Anda bebas menolak ikut dalam penelitian ini atau bebas mengundurkan diri pada setiap saat ketika penelitian sedang berjalan. Anda juga bebas menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini.

Bila Anda tidak mentaati instruksi yang diberikan oleh tim peneliti, Anda dapat dikeluarkan dari penelitian ini setiap saat.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan RS.Kanker Dharmais.

Bila sewaktu-waktu Anda memerlukan penjelasan, Anda dapat menghubungi dokter Yenny di nomor 08159661333.

Lampiran 6. Formulir Persetujuan Setelah Penjelasan

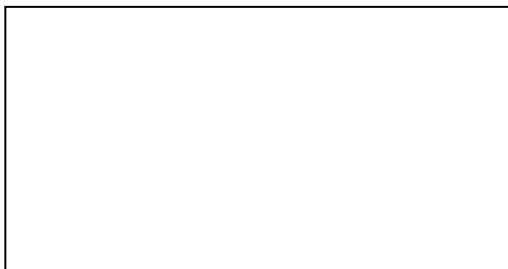
PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN

Saya telah mendapat penjelasan mengenai penelitian tersebut di atas dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh dokter tim peneliti. Saya juga telah diberi cukup waktu untuk mempertimbangkan keikutsertaan saya dalam penelitian ini dan saya mengerti bahwa bila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari Dr. Yenny.

Dengan menandatangani formulir ini, saya menyatakan setuju untuk ikut serta dalam penelitian ini.

Tanda tangan subjek penelitian:

Tanggal:



(Nama jelas:)

Nomor telpon/Hp :

Nomor RM :

Lampiran 7. Formulir Pengumpulan Data

Formulir D. Formulir Pengumpulan Data**Kode Responden** **No. Rekam medis** **Tanggal** **Petunjuk pengisian kuesioner**

Harap mengisi jawaban di tempat yang ada titik-titik atau lingkari jawaban yang menurut Anda paling tepat

I. Identitas Subjek

Nama :

Tempat/ tanggal lahir :, Usia:tahun

Alamat :

RT/RW:, Kelurahan

Kecamatan:

No. Telp/Hp :

II. Karakteristik subjek

1. Usia Anda saat terdiagnosis kanker payudara : tahun
2. Apakah Anda masih memperoleh haid saat didiagnosis kanker?
 1. Ya
 2. Tidak
3. Kapan terakhir kalinya Anda memperoleh menstruasi?tahun
4. Apakah Anda menggunakan kontrasepsi hormon atau terapi pengganti hormon?
 1. Ya
 2. Tidak
5. Apakah Anda pernah menjalani operasi pengangkatan rahim atau indung telur?
 1. Tidak
 2. Ya

6. Waktu minum tamoksifen sehari-hari adalah: (tuliskan jam minum obat)
1. Selain malam (pagi – sore)
 2. Malam

III. Pengukuran antropometrik (diisi oleh Petugas)

Pengukuran	Hasil		
	1	2	Rata-rata
Tinggi badan (m)			
Berat badan (kg)			
IMT (kg/m^2)			
			1. $<18,5$ 2. $18,5 - 22,9$ 3. $23 - 24,9$ 4. $25 - 29,9$ 5. ≥ 30
Lingkar pinggang (cm)			
Lingkar pinggul (cm)			
Waist/hip ratio			

Catatan: dicatat sampai 1 angka dibelakang koma

Untuk pertanyaan nomor 7–34 tidak usah di jawab (diisi oleh petugas)

7. Status menopause Anda saat diobati dengan kanker payudara (diisi oleh petugas)
1. Premenopause
 2. Pascamenopause
8. Lama mengkonsumsi tamoksifen: bulan
9. Ukuran tumor (T) pada saat terdiagnosis?
1. < 2 cm
 2. $2 - 5$ cm
 3. > 5 cm
10. Apakah melekat ke kulit?
1. Tidak
 2. Ya
11. Apakah melekat ke dinding dada?
1. Tidak
 2. Ya
12. Keterlibatan kelenjar getah bening (N) pada saat terdiagnosis?
1. Ada
 2. Tidak

13. Jumlah kelenjar getah bening (N) yang terlibat saat terdiagnosis?

1. 0
2. 1 – 4
3. 5 – 9
4. 10 – 20
5. > 20

14. Nodus supraklavikular teraba?

1. Tidak
2. Ya

15. Apakah ada metastasis (M)?

1. Tidak
2. Ya
3. Tidak dapat ditentukan

16. Stadium KPD subjek studi :

1. Stadium 0
2. Stadium I
3. Stadium IIA
4. Stadium IIB
5. Stadium III A
6. Stadium III B
7. Stadium III C
8. Stadium lanjut

17. Pengelompokan stadium KPD subjek studi:

1. Stadium dini (0, I, IIA, IIB)
2. Stadium lanjut lokal (III A, B, C)
3. Stadium lanjut (IV)

18. Persentase reseptor estrogen (ER) : %

19. Persentase reseptor progesteron (PgR): %

20. Persentase Ki-67 :%

21. Grade HER-2 :..

1. grade 0
2. grade +1
3. grade +2
4. grade +3

22. Subtipe molekuler subjek

1. Luminal A
2. Luminal B (HER-2 negatif)
3. Luminal B (HER-2 positif)

23. Tipe histologi tumor (diagnosis patologi anatomi)
1. *Invasive lobular carcinoma* (ILC)
 2. *Invasive ductal carcinoma* (IDC)
 3. Lainnya
24. Kanker payudara bilateral?
1. Tidak
 2. Ya
25. Indikasi pemberian terapi tamoksifen:
1. Adjuvant
 2. Neoadjuvant
 3. Primer
26. Jenis terapi yang diberikan:
1. Hormon terapi (HT) saja
 2. HT + radioterapi (RT)
 3. RT
 4. Kemoterapi (CT) + RT
 5. CT + HT
 6. CT + trastuzumab
 7. CT (tanpa trastuzumab pada HER-2+)
27. Urutan jenis terapi yang diberikan (beri nomor sesuai urutan waktu pemberian terapi)
- ☐ Operasi
 - ☐ RT
 - ☐ ChT
 - ☐ HT
 - ☐ Trastuzumab
28. Obat-obat yang dikonsumsi saat pengumpulan data: .
-
-
-
-
-
29. Interaksi obat
1. Tidak ada
 2. ada

30. Kepatuhan minum obat (*adherence*)?
1. Kepatuhan rendah
 2. Kepatuhan sedang
 3. Kepatuhan tinggi
31. nilai SGPT: U/L
nilai SGOT: U/L
32. Rasio SGOT/SGPT :
33. Genotip subjek:
1. C/C
 2. C/T
 3. T/T
34. Fenotip subjek:
1. EM/UM
 2. IM
 3. PM
35. Kadar Z-END subjek: ng/mL

IV. Kepatuhan minum tamoksifen (*adherence*)

Petunjuk pengisian kuesioner:

Berilah tanda (✓) pada kolom yang sesuai.

Morisky medication adherence scale-8 (MMAS-8)

No.	Pertanyaan		
1.	Apakah Anda kadang-kadang lupa minum obat tamoksifen?	()Tidak =1	()Ya=0
2.	Seseorang kadang-kadang tidak minum obat karena beberapa alasan selain lupa. Selama 2 minggu terakhir, apakah Anda pernah tidak minum obat tamoksifen?	()Tidak =1	()Ya=0
3.	Apakah Anda pernah menghentikan minum tamoksifen tanpa memberitahu dokter karena Anda merasa tidak enak bila mengkonsumsi tamoksifen?	()Tidak =1	()Ya=0
4.	Ketika Anda berpergian atau meninggalkan rumah, apa kadang-kadang Anda pernah lupa tidak membawa obatnya?	()Tidak =1	()Ya=0
5.	Apakah Anda minum obat tamoksifen kemarin?	()Tidak =0	()Ya=1
6.	Ketika Anda merasa kondisi Anda lebih baik apakah Anda pernah menghentikan/tidak menggunakan tamoksifen?	()Tidak =1	()Ya=0
7.	Minum obat setiap hari kadang membuat orang merasa tidak nyaman. Apakah Anda merasa terapi tamoksifen yang didapat ini rumit/kompleks?	()Tidak =1	()Ya=0
8.	Apakah Anda sering mengalami kesulitan mengingat minum tamoksifen? A. Tidak pernah/jarang B. Sekali waktu C. Kadang-kadang D. Biasanya E. Sepanjang waktu	() A=4 () B=3 () C=2 () D=1 () E=0 Skor dibagi 4	

Penilaian:

- 8 = kepatuhan tinggi
 6 — < 8 = kepatuhan sedang
 < 6 = kepatuhan rendah

V.1. Efek samping obat (depresi)

Petunjuk pengisian kuesioner:

Berilah tanda (✓) pada kolom yang sesuai.

Zung's self-rating depression scale

No	Uraian	Hanya sedikit	Kadang-kadang	Cukup sering	Hampir sepanjang waktu
1.	Saya merasa mental saya jatuh dan sedih	1	2	3	4
2.	Pagi adalah saat dimana perasaan saya paling baik	4	3	2	1
3.	Saya merasa ingin menangis	1	2	3	4
4.	Saya mengalami problem tidur di malam hari	1	2	3	4
5.	Saya makan sebanyak biasa saya lakukan	4	3	2	1
6.	Saya tetap dapat menikmati seks	4	3	2	1
7.	Saya perhatikan berat badan saya turun	1	2	3	4
8.	Saya punya masalah dalam buang air besar	1	2	3	4
9.	Detak jantung saya lebih cepat dari biasanya	1	2	3	4
10.	Saya lelah tanpa sebab	1	2	3	4
11.	Pikiran saya sejeernih sebagaimana biasanya	4	3	2	1
12.	Saya merasa mudah untuk melakukan hal-hal yang dulu biasa saya lakukan	4	3	2	1
13.	Saya merasa tidak tenang dan tidak dapat berdiam diri	1	2	3	4

14.	Saya merasa penuh harapan akan masa depan	4	3	2	1
15.	Saya lebih mudah tersinggung daripada biasanya	1	2	3	4
16.	Saya merasa mudah untuk memutuskan sesuatu	4	3	2	1
17.	Saya merasa berguna dan dibutuhkan	4	3	2	1
18.	Kehidupan saya baik-baik saja	4	3	2	1
19.	Saya merasa orang lain akan lebih baik jika saya meninggal	1	2	3	4
20.	Saya masih menikmati hal-hal yang dulu saya lakukan	4	3	2	1

Penilaian:

SDS Index <50 = tidak depresi
 SDS Index 50 — 59 = depresi ringan
 SDS Index 60 — 69 = depresi sedang
 SDS Index $\geq$ 70 = depresi berat

V.2. Efek samping obat (*hot flashes*)

Petunjuk pengisian kuesioner:

Pertanyaan di bawah ini berkaitan dengan situasi sebelum terapi tamoksifen dimulai dan situasi pada saat pengambilan darah dilakukan. Harap lingkari angka yang menurut Anda paling cocok dengan situasi yang Anda rasakan.

0 = tidak ada

1 = ringan

2 = sedang

3 = berat

4 = sangat berat

		Sebelum terapi tamoksifen						Selama terapi tamoksifen				
1.	Apakah Anda mengalami <i>hot flashes</i> ?	Ya/tidak						Ya/tidak				
	a. Berapa kali Anda mengalami <i>hot flashes</i> ? (lingkari hari/minggu)	... kali per hari/minggu						... kali per hari/minggu				
	b. Rata-rata beratnya <i>hot flashes</i> yang dirasakan	0	1	2	3	4		0	1	2	3	4
2.	Apakah Anda mengalami gangguan suasana perasaan (<i>mood swing</i>)?	0	1	2	3	4		0	1	2	3	4
3.	Apakah Anda mengalami berkeringat berlebihan?	0	1	2	3	4		0	1	2	3	4
4.	Apakah Anda mengalami gangguan tidur?	0	1	2	3	4		0	1	2	3	4
5.	Apakah Anda mengalami gejala lain yang mungkin berhubungan dengan terapi tamoksifen yang diberikan?	Ya/tidak						Ya/tidak				
	Bila menjawab ya pada pertanyaan no.5, gejala lain apa yang dirasakan?											

Definisi *hot flashes*

Untuk mendeskripsikan beratnya *hot flashes* yang Anda rasakan, harap memilih salah satu kategori *hot flashes* yang ada di bawah ini (lingkari pilihan Anda).

Ringan

Lama : 5 menit

Gejala fisik : hangat, rasa tidak nyaman, wajah merah

Gejala emosional : not expected

Tindakan : tidak ada

Sedang

Lama	: 15 menit
Gejala fisik	: kepala, leher, telinga atau seluruh tubuh terasa hangat, tegang, otot kencang, kulit lembab, perubahan frekuensi dan irama jantung (detak jantung meningkat/ terjadi perubahan irama jantung), berkeringat, mulut kering.
Gejala emosional	: mudah tersinggung, tidak tenang, perasaan semua energi habis,
perasaan	malu bila mengalami <i>hot flash</i> di depan orang lain, merasa cepat
lelah,	merasa terganggu
Tindakan	: membutuhkan penggunaan kipas angin, kadang terbangun malam hari, merasa perlu untuk membuka baju/selimut, minum air, membuka jendela bahkan saat cuaca dingin di luar, menggunakan baju setipis mungkin.

Berat

Lama	: 20 menit
Gejala fisik	: rasa hangat seperti oven yang menyala, perubahan frekuensi jantung atau ritme (kecepatan jantung meningkat/perubahan irama jantung), merasa mau pingsan, sakit kepala, berkeringat berlebihan, kelemahan, rasa gatal, sensasi tersengat pada kulit, rasa berat pada dada
Gejala emosional	: rasa malu, gugup, punya perasaan serangan panik
Tindakan	: perlu menghentikan apa yang dikerjakan pada saat <i>hot flashes</i> dirasakan, bangun malam hari dan membuka selimut, merasa perlu membuka baju, membuka jendela, mempertahankan suhu rumah pada temperatur yang lebih dingin, sering menggunakan kipas angin.

Sangat berat

Lama	: 45 menit
Gejala fisik	: rasa panas seperti mendidih, keringat bercucuran, kesulitan bernapas, merasa mau pingsan, merasa pusing,

	kaki dan/paha kram, perubahan kecepatan jantung atau ritme (kecepatan jantung meningkat/perubahan irama jantung), rasa sakit ringan pada perut.
Gejala emosional	: perasaan distres, keinginan untuk melarikan diri, kesulitan melakukan fungsi.
Tindakan	: sering terbangun pada malam hari, merasa perlu untuk mengganti seprei dan baju tidur, merasa perlu untuk mandi air dingin, merasa perlu untuk menaruh es di atas kulit.

Lampiran 8. Formulir Pengambilan Darah

<u>Form. pengambilan darah</u> Nama : Umur : Tanggal: No.RM : SNo : Waktu ambil darah : Paraf Laboran :	<u>Form. pengambilan darah</u> Nama : Umur : Tanggal: No.RM : SNo : Waktu ambil darah : Paraf Laboran :
<u>Form. pengambilan darah</u> Nama : Umur : Tanggal: No.RM : SNo : Waktu ambil darah : Paraf Laboran :	<u>Form. pengambilan darah</u> Nama : Umur : Tanggal: No.RM : SNo : Waktu ambil darah : Paraf Laboran :
<u>Form. pengambilan darah</u> Nama : Umur : Tanggal: No.RM : SNo : Waktu ambil darah : Paraf Laboran :	<u>Form. pengambilan darah</u> Nama : Umur : Tanggal: No.RM : SNo : Waktu ambil darah : Paraf Laboran :

Lampiran 9. *Case Report Form*

***CASE REPORT FORM* SUBJEK STUDI TAMOKSIFEN**

[illegible]

Lampiran 10. Formulir Waktu Pengambilan Darah

WAKTU PENGAMBILAN DARAH SUBJEK STUDI TAMOKSIFEN

Sno.	Inisial Nama	Umur (th)	No.RM	Tanggal	Waktu				Gen	SGPT/ SGOT	Catatan
					Minum DMP	Ambil darah	Kadar 1	Kadar 2			

Lampiran 9. *Case Report Form*

Lampiran 10. Bukti *Submit* Jurnal

12/11/2018

Gmail - Submission Acknowledgement | BMS-EMIDDT-2018-157



Yenny Y <yenfarmako@gmail.com>

Submission Acknowledgement | BMS-EMIDDT-2018-157

2 messages

Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets

Mon, Dec 10, 2018 at 7:52 PM

<admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Reply-To: "Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets" <emiddt@benthamscience.net>

To: yenfarmako@gmail.com

Cc: emiddt@benthamscience.net, humaira.shabbir@benthamscience.org, swear@centrin.net.id

Reference#: BMS-EMIDDT-2018-157

Submission Title: Association of CYP2D6*10 (c. 100 C>T) genotype with Z-END Concentration in Patients with Breast Cancer Receiving Tamoxifen Therapy in Indonesian Population

Dear Dr. Yenny,

Thank you for your submission to "Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets(EMIDDT)". It will be sent to the Editor in Chief for his initial provisional approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **CrossCheck's iThenticate software** to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's **Ethical Guidelines for Publication**, all manuscript are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <https://www.benthamscience.com/journals/endocrine-metabolic-and-immune-disorders-drug-targets/editor>.

The recommended number of references as per norm (<https://clarivate.com/essays/impact-factor/>) for Review Articles is approximately 100 or more and for Research Articles 75 or more. Articles which are well referenced (100 or more references) may have high chances of acceptance by referees and they are likely to attract a greater number of citations.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name: Emilio Jirillo

Affiliation: University of Bari, Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs

Country:

Email: jirillo@midim.uniba.it

Few tips to enhance the visibility & citations of your article:

- Selection of Appropriate Keywords: Choose important and relevant keywords that researchers in your field will be searching for so that your paper will appear in a database search. In biomedical fields, MeSH terms are a good 'common vocabulary' source to draw keywords from <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>
- The names of the authors should be provided according to the previous citations or as the authors would want

Association of CYP2D6*10 (c. 100 C>T) genotype with Z-END Concentration in Patients with Breast Cancer Receiving Tamoxifen Therapy

in Indonesian Population

Yenny,^{1,2} Sonar S Panigoro,³ Denni J Purwanto,⁴ Adi Hidayat,⁵ Melva Louisa,⁶
Rizka Andalusia,⁷ Rinato Setiabudy⁶

1. Doctoral Program, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia
2. Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Trisakti University, Jakarta, Indonesia
(yenfarmako@gmail.com)
3. Surgical Oncology Division, Department of Surgery, Dr. Cipto Mangunkusumo General Hospital, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia
(sonarpanigoro@gmail.com)
4. Surgical Oncology Department, Dharmas National Cancer Center Hospital, Jakarta, Indonesia
(dennijoko@gmail.com)
5. Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Trisakti University, Jakarta, Indonesia
(swear@centrin.net.id)
6. Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia.
(melva.louisa@gmail.com for LM; rianto_set@yahoo.com for RS)
7. Department of Research and Development, Dharmas National Cancer Center Hospital, Jakarta, Indonesia
(rizka_andalusia@yahoo.com)

Further communications about the manuscript should be directed to:

Yenny, Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Trisakti University

Jl. Kyai Tapa no 260, Grogol, Jakarta 11440, Indonesia.

Phone: +62-21-5655786, Fax: +62-21-5660706

E-mail: yenfarmako@gmail.com

Address reprint requests to:

Yenny, Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Trisakti University

Jl. Kyai Tapa no 260, Grogol, Jakarta 11440, Indonesia.

E-mail: yenfarmako@gmail.com

Short running title : CYP2D6*10 genotype and Z-END Concentration

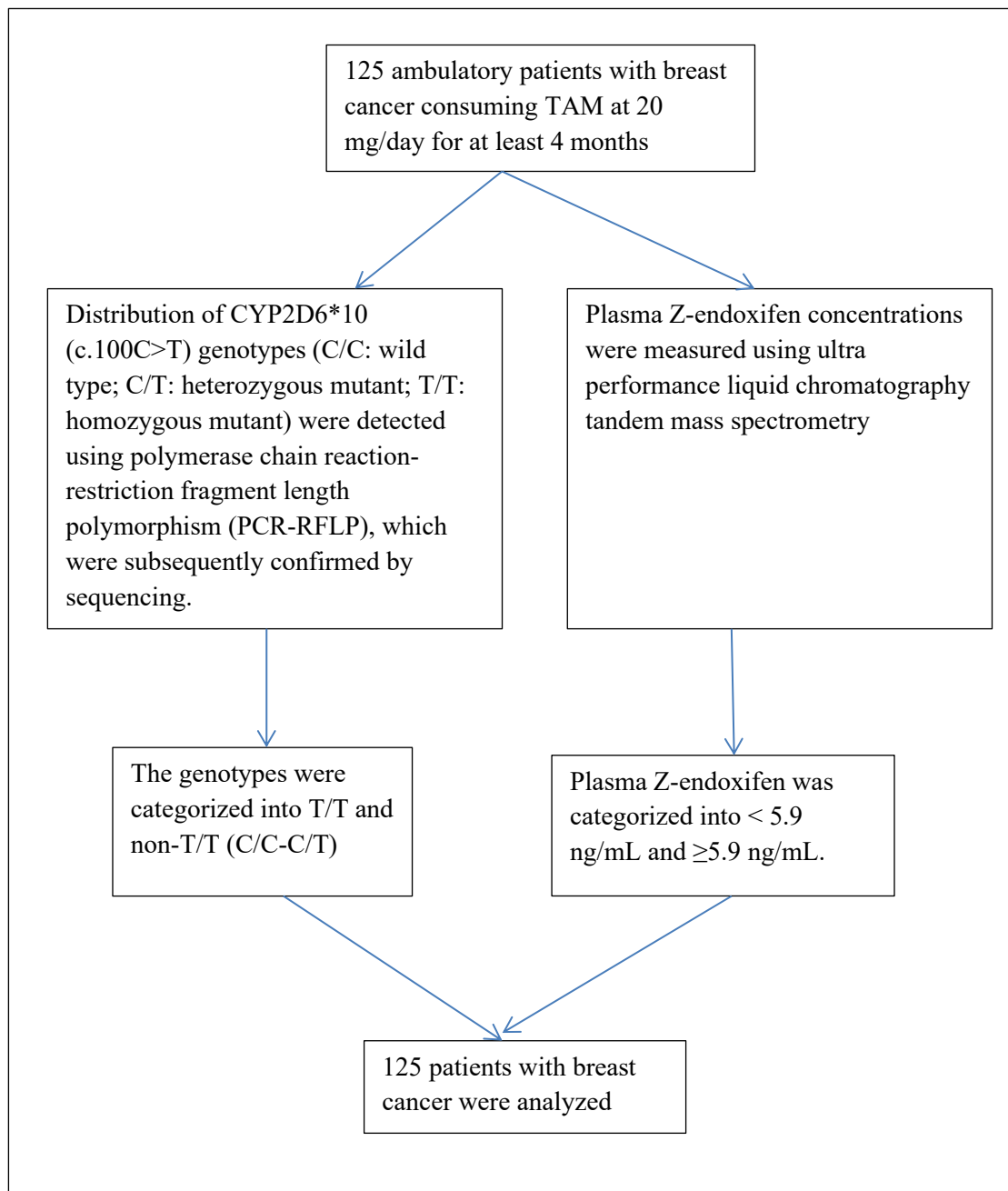
Abstract

Tamoxifen (TAM) is a frequently used hormonal drug for patients with breast cancer. It is a prodrug that needs to be activated by cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) into endoxifen (END). The purpose of the present study was to determine the association of the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotype with attainment of the plasma steady state Z-END minimal threshold concentration (MTC) in patients with breast cancer in Indonesia. A cross-sectional study was performed in 125 ambulatory patients with breast cancer consuming TAM at 20 mg/day for at least 4 months. The frequency distribution of CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes (C/C: wild type; C/T: heterozygous mutant; T/T: homozygous mutant) was detected using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), the results of which were subsequently confirmed by sequencing. The genotypes were categorized into plasma Z-END concentrations of <5.9 ng/mL and $\geq$ 5.9 ng/mL, which were measured using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Percentages of C/C, CT, and T/T genotypes were 22.4%, 29.6%, and 48.8%, respectively. The median (25–75%) Z-END concentrations in C/C, C/T, and T/T genotypes were 9.58 (0.7–6.0), 9.86 (0.7–26.6), and 3.76 (0.9–26.6) ng/mL, respectively. Statistical analysis showed a significant difference in median Z-END concentration between patients with T/T genotype and those with C/C or C/T genotypes ($p < 0.001$). There was a significant association between CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes and attainment of plasma steady state Z-END MTC ($p < 0.001$).

Keywords: CYP2D6*10 (c.100C>T), tamoxifen, Z-endoxifen, steady state concentration, Indonesian population.

GRAPHICAL ABSTRACT

This study demonstrated that there was a significant association between CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes and attainment of plasma steady state Z-END MTC ($p<0.001$) in Indonesian breast cancer patients receiving tamoxifen.



INTRODUCTION

Tamoxifen (TAM) is a drug currently used in the hormonal therapy of patients with estrogen receptor-positive breast cancer [1-2], including in Indonesia [3]. Tamoxifen is a prodrug that needs to be converted into its active metabolite *Zusammen*-endoxifen (Z-END), particularly by cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) [4]. There are still many patients on TAM who have recurrences after 5 years of treatment [5]. One of the factors that plays a causative role in these recurrences is the Z-END concentration that shows a wide variation between individuals [6]. Madlensky *et al.*, (2011) [5] showed that a Z-END concentration above the minimal threshold concentration (MTC) of 5.9 ng/mL carries a 26% significantly lower risk for recurrences than does a Z-END concentration below 5.9 ng/mL. Based on these study results the Z-END concentration is a potential indirect marker for predicting the therapeutic response to TAM. The Z-END MTC is among others influenced by CYP2D6 gene polymorphism that may alter its function and/or the resulting amounts of gene products. CYP2D6*10 is the allele that is frequently found in Asian ethnic groups (28.9–58.5%) [7-9]. The CYP2D6*10 allele results from the substitution c.100C>T in exon 1, causing the substitution of proline 34 into serine (Pro34Ser), which leads to an unstable enzyme of low activity [10].

A meta-analysis aimed at evaluating the effects of CYP2D6*10 polymorphism (c.100 C>T, rs1065852) on the clinical outcomes of BC patients of Asian ethnicity, who received TAM adjuvant therapy, showed a significant relationship between the genotype *10/*10 (T/T) and disease-free survival and recurrences [11]. On the other hand, there are as yet no data from Indonesia.

The study by Hennig *et al.* (2015) [12] showed that the CYP2D6 genotype polymorphisms can explain only 27% of steady-state Z-END concentrations and supports the opinion that direct measurement of plasma steady-state Z-END concentration is better as the basis of individualizing of doses. The present study aimed to determine the association between CYP2D6*10 (c.100C>T) and attainment of plasma steady-state Z-END MTC in patients with breast cancer in Indonesia receiving TAM at a dose of 20 mg/day.

MATERIALS AND METHODS

Study design and subjects

This cross-sectional study, for which the subjects were recruited consecutively, was conducted from October 2017 to February 2018 at the Dharmas National Cancer Center Hospital, Jakarta, Indonesia. A total of 125 ambulatory patients with breast cancer using TAM at 20 mg/day for at least 4 months were invited for participation in this study. The exclusion criterion in this study was serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) concentration of > 2.5 times above the normal limit.

Clinical blood chemistry

A total of 5-mL venous whole blood samples were obtained and stored in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for determination of Z-END concentrations and genotyping. Data on baseline demographic and clinical characteristics and potential drug interactions were also recorded in this study. Blood samples for determination of genotype and Z-END concentration were collected 6–24 hours after consumption of TAM.

Determination of CYP2D6*10 genotype (c.100C>T)

DNA extraction and primer sequences

DNA extraction from 2 mL whole blood samples containing EDTA was performed using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). The primer sequences used in this study were according to the method of Bagheri *et al.* (2015) [13], with as forward (F) primer 5'-TCAACACAGCAGGTTCA-3' and reverse (R) primer 5'-CTGTGGTTTCACCCACC-3' and the method of Modaresi-nejad *et al.* (2015) [14] with the following forward and reverse primers, i.e. 5'-GTCAACACAGCAGGTTCACTCAC-3' and 5'-GTATAAATGCCCTTCTCCAGGAAGT-3', respectively.

Restriction fragment length polymorphism

Genotyping of the CYP2D6*10 allele (100C>T); (rs no.1065853) was performed using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) based on the method of Bagheri *et al.* (2015) [13]. PCR amplification was performed with DNA 4 µL, nuclease-free water 6 µL, Hotstar Taq master mix 12.5 µL, and forward and reverse primers 1.25 µL each. The PCR reaction conditions used were as follows: initial denaturation at 95 °C for 15 minutes for a total of one

cycle, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 56 °C for 30 seconds, extension at 72° C for 30 seconds, and final extension at 72° C. Visualization of the PCR digestion products was by means of electrophoresis using 2.5% agarose gel at 100 V for 35 minutes.

Gene sequencing of CYP2D6*10 (c.100C>T)

Gene sequencing of CYP2D6*10 was performed for 3 samples, representing the wild-type CYP2D6 (C/C), homozygous mutant (T/T), and heterozygous mutant (C/T) genotypes, respectively, for confirmation of the PCR RFLP results and of the mutation types occurring in the analyzed CYP2D6 gene area.

The sequencing was done in the Department of Research and Development, Dharmas National Cancer Center Hospital, using a Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing results were subsequently analyzed using the SeqScape software and compared with the CYP2D6 reference gene sequences at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under accession number M33388.

Measurement of Z-END concentration

The quantification of plasma Z-END concentration was performed using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The plasma samples were prepared by adding aliquots of 40 µL of bisoprolol internal standard solution of 800 ng/mL to 400 µL of plasma samples in 2 mL microcentrifuge tubes, after which 600 µL 0.1% formic acid in acetonitrile was added to each of the tubes. Then the samples were vigorously mixed for 30 seconds and centrifuged at 14000 rpm at room temperature for 5 minutes. Aliquots of the organic phase were transferred into 10 ml glass tubes and evaporated under nitrogen at 55°C. The residues were resuspended in 300 µL aliquots of 0.1% formic acid in acetonitrile, then the samples were transferred into 2 mL vials and injected onto the UPLC column.

The UPLC–MS/MS assay was performed using Waters Aquity® UPLC Sample Manager coupled to a Waters TQ Detector. Quantification was performed using QuanLynx as implemented in the MassLynx software. Analytes were separated on an Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2.7µm) 2.1 mm x 50 mm column at a flow-rate

of 0.3 ml per minute on isocratic phase of acetonitrile and 0.1% formic acid (40:60). The run time of Z-END in the plasma sample was approximately 1.26–1.32 minutes. The multiple reaction monitoring transitions was set at 374.25 > 58.11 (m/z) for Z-END. The calibration curves were linear ($R^2 \geq 0.990$) over the range of 0.5 – 50 ng/mL with the lower and upper limits of quantification of Z-END validated at 0.5 ng/mL and 50 ng/mL, respectively.

Statistical analysis

Descriptive analysis was performed on all collected variables. The data distribution was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. The percentage of the CYP2D6*10 genotype (c.100C>T) was presented in the form of a histogram. The Kruskal-Wallis test was used to find differences in median concentrations between the three genotypes, followed by the post-hoc Mann-Whitney test for finding the group yielding a significant difference. The chi-square test was used to determine the relationship between the CYP2D6*10 genotype and the attainment of Z-END MTC. The results were presented as an odds ratio (OR), 95% confidence interval (95%CI), and p value. The limit of statistical significance used was $p < 0.05$.

Ethical clearance

This study was conducted in accordance with the requirements of the Helsinki Declaration and obtained approval of the Health Research Ethics Committee, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia under registration number 613/UN2.F1/ETIK/2017 and the Ethics Committee, Dharmas National Cancer Center Hospital under registration number 054/KEPK/VIII/2017.

RESULTS

Baseline data on characteristics of the study subjects consisting of age, BMI, time point of TAM consumption, duration of TAM consumption, drug interactions, and SGPT concentration, can be seen in Table 1.

Table 1. Distribution of baseline characteristics of study subjects (n = 125)

Baseline Characteristic	Mean $\pm$ SD	n (%)
- Age (years)	44.5 $\pm$ 7.4	
< 60 years		119 (95.2)
$\geq$ 60 years		6 (4.8)
- BMI (kg/m ²)	24.5 $\pm$ 3.9	
Underweight		5 (4.0)
Normal weight		41 (32.8)
Overweight		29 (23.2)
Obese		50 (40.0)
- Duration of TAM consumption (months) [median (min–max)]	16 (4–90)	
- Time point of TAM consumption		
Not at night		44 (35.2)
At night		81 (64.8)
- BC stage		
Early stage		72 (57.6)
Locally advanced stage		44 (35.2)
Advanced stage		9 (7.2)
- CYP2D6 drug interaction		
Yes		1 (0.8)
No		124 (99.2)
-SGPT concentration (U/L)[median (min–max)]	17.0 (6.0–56)	
Normal		99 (79.2)
High		26 (20.8)

Legend:

Body mass index (BMI): underweight (BMI < 18), normal weight (BMI = 18.5–22.9), overweight (BMI = 23.0–24.9), obesity (BMI > 25); time point of TAM consumption: at night (19.00–24.00 WIB), not at night (01.00–<19.00 WIB); BC stage (BC stage determined at initial diagnosis, early stage: 0, I, IIA, and IIB; locally advanced stage (IIIA,B,C;); advanced stage (IV); CYP2D6 drug interaction: yes = present (if TAM is administered in combination with other drugs that are also metabolized by CYP2D6), no = absent (if TAM is administered in combination with other drugs that are also metabolized by CYP2D6); SGPT concentration: normal (0–32 U/L), high (> 32 U/L).

The resulting PCR product (amplicon) was 433 bp in size. The genotype was determined based on the bp size of the DNA fragments formed after digestion by H_pHI. The patterns resulting after gel electrophoresis were as follows: homozygous wild-type (C/C = 362 bp + 71 bp), heterozygous mutants (C/T= 362 bp, 262 bp, 100 bp, 71 bp), and homozygous mutants (T/T= 262 bp, 100 bp, 71 bp) (Figure 1.). Of the total of 125 subjects, 120 were successfully genotyped using the primers of Bagheri *et al.*, (2015) [13], but of the remaining 5 subjects no PCR products were found using above primers.

For confirmation of the PCR-RFLP results, 3 subjects were selected at random, representing the genotypes C/C, C/T, and T/T. The sequenced samples were subjects number 9 (homozygous mutant genotype), number 3 (heterozygous mutant genotype), and number 41 (homozygous wild-type genotype) who had previously been analyzed with the PCR-RFLP method (Figure 2.).

The mutation point was located at base number 270 in the PCR sequencing product (433 bp). At base no. 270, the homozygous mutant (T/T) showed the base T, the heterozygous mutant (C/T) showed the bases C or T (marked as Y), and the homozygous wild-type (C/C) showed the base C (Figure 2.). The sequencing results were compared with the reference sequence of the CYP2D6 gene at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under accession number M33388.

The genotyping results of the 120 subjects showed that the homozygous mutant (T/T) comprised 23 subjects (19.2%), the heterozygous mutant (C/T) 37 subjects (30.8%), and the homozygous wild-type genotype 60 subjects (50%).

The 5 samples yielding negative PCR products with the primers of Bagheri *et al.*, (2015) [13] were subsequently subjected to PCR using the primers of Moderasi-Nejad *et al.*, (2015) [14]. The resulting PCR products were 503 bp in size and were then sequenced. The sequencing results of the 5 samples can be seen in Figure 3.

On the basis of the sequencing results it may be concluded that the genotype of the five samples were homozygous wild-type, as can be seen from the presence of base C at base no. 271 in the PCR product (503 bp).

The highest frequency of the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes in the 125 study subjects was for the homozygous mutant /T/T (48.0%).

The median (25–75%) Z-END concentrations of each genotype were as follows: genotype C/C = 9.58 (0.7–6.0) ng/mL, C/T = 9.86 (0.7–26.6) ng/mL, and T/T = 3.76 (0.9–26.6) ng/mL. The results of the analysis with the Kruskal Wallis test showed a statistically significant difference between the three genotypes ($p < 0.001$) (Figure 4.). The post-hoc analysis with the Mann Whitney test showed a difference between genotype T/T on the one hand and genotypes C/C and C/T on the other ($p < 0.001$).

Based on the results in Figure 4, the CYP2D6*10 genotypes was categorized as T/T and non-T/T (C/C and C/T).

The Chi-square analysis showed that there was a significant difference between genotype and attainment of plasma steady state Z-END MTC (OR=0.076;95% Confidence Interval 0.032-0.179; $p < 0.001$).

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the percentages in the Indonesian population of the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes in the steady state in patients with breast cancer who received TAM at 20 mg/day. The results of this study showed the following percentages for the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes: the homozygous mutant (T/T) was the most frequent genotype with 48.0%, followed by the heterozygous mutant (C/T) with 29.6%, and the homozygous wild-type genotype (C/C) with 22.4%. In contrast with these study results, the highest proportion of the genotype in the Philippines and China was for C/T with a proportion of 56% [10] and 43%, respectively [15]. Our study confirms that among Asians, the prevalence of CYP2D6*10 (c.100C>T) differs between ethnic groups. The BC subjects in Indonesia need further attention, since in contrast with both above-mentioned studies, in Indonesia the highest proportion of BC patients receiving TAM is of the genotype T/T (48%).

This study showed that the median (25–75%) Z-END concentrations for genotypes C/C, C/T, and T/T were 9.58 (0.7–6.0) ng/mL, 9.86 (0.7–26.6) ng/mL, and 3.76 (0.9–26.6) ng/mL, respectively. The median plasma Z-END concentration for genotype T/T was significantly the lowest as compared with the two other genotypes ($p < 0.001$). From the results of this study it is apparent that subjects with genotype C/T did not significantly change the plasma Z-END concentration, whereas the subjects with genotype T/T did significantly change the plasma Z-END concentration.

There were not many studies that compare the END concentrations based on CYP2D6*10 (c.100C>T) genotype. The Chinese study of Lei *et al.*, (2016) [15] showed results that are similar to ours, in that genotype T/T had significantly the lowest END concentration as compared with the other two genotypes. In our study, the median Z-END concentration for genotype T/T was 3.76 (0.9–26.6) ng/mL, whereas in the study of Lei *et al.*, (2016) [15] the mean $\pm$ SD Z-END concentration was 10.72 ± 4.00 ng/mL. Although there are differences in the presentation of the data between the present study and that of Lei *et al.*, (2016) [15], the results of the present study are consistent with those of Lei *et al.*, (2016) [15] who showed that the plasma Z-END concentration changes upon the occurrence of base substitutions or mutations in both the bases composing the functional CYP2D6*10 alleles.

The study conducted by Kiyotani *et al.*, (2010)[16] in Japan aimed to find the relationship between the CYP2D6*10 genotype and END concentrations. The median END concentrations for wt/wt (wild-type/wild-type), wt/V (wild-type/variant), and V/V (variant/variant) were 35.4 ng/mL, 27.2 ng/mL, and 15.5 ng/mL, respectively. Consistent with our study results, Kiyotani *et al.*, (2010) [16] also found a significant difference in END concentrations, the lowest concentration being for genotype V/V ($p = 0.0000043$).

The study conducted by Love *et al.*, (2013) [17] in the Philippines and Vietnam on BC subjects receiving TAM adjuvant therapy was also for the purpose of determining the relationship between CYP2D6 genotype and END concentrations. Their study showed that the mean $\pm$ SD END concentration for the normally functioning alleles (*1, *2) was 48.2 ± 39.7 ng/mL, for the alleles with decreased function (heterozygous *10, *41) 39.3 ± 26.6 ng/mL, and for the alleles with poor activity (homozygous *10, *41, and one or more nonfunctional null alleles) 25.0 ± 22.3 ng/mL. Their study showed significant differences in END concentrations, the lowest being for the alleles with poor activity or the nonfunctional alleles ($p < 0.0001$).

The studies of Lei *et al.*, (2013) [15] Kiyotani *et al.*, (2016) [16] and Love *et al.*, (2013)[17] were all conducted on Asian subjects, but showed differences in study results. The differences in Z-END concentrations may have been due to differences in ethnicity, resulting in CYP2D6*10 polymorphism. Another difference is that the three studies measured total END concentrations (comprising E- and Z-END isomers), whereas it is well-recognized that the E-END isomer is a weak agonist with an affinity of $< 1\%$ in ER as compared with the Z-END isomer [18]. The present study conducted on Indonesian BC subjects specifically measured the Z-END concentration. The study of Kiyotani *et al.*, (2016) [16] measured CYP2D6*10 in both alleles, while the study conducted by Love *et al.*, (2013) [17] investigated not only *10, but also several other alleles. On the other hand, the present study and that of Lei *et al.*, (2016) [15] measured mutations in one allele only, namely CYP2D6*10 (c.100C>T). Apart from the differences between the existing studies, consistent with the previous studies, the present study also showed differences in END concentrations between the three genotypes.

Bivariate analysis found a statistically significant relationship between genotype and attainment of Z-END concentration ($p < 0.001$), but genotype cannot be used as the sole criterion in looking at the relationship between genotype and attainment of plasma Z-END concentration. There are multiple factors capable of affecting plasma Z-END concentration, in addition to CYP2D6 genotype, such as the use of TAM in combination with other drugs (e.g. paroxetine/fluoxetine [19,20], rifampicin [21], and drug adherence [22] that may influence Z-END concentration. In the present study, other drugs consumed at the time of data collection were also recorded. Since the formation of END is mainly through CYP2D6, the use of TAM in combination with selective serotonin receptor inhibitors (SSRI), which are CYP2D6 inhibitors, may result in inhibition of TAM metabolism and decrease the formation of plasma END [19, 23, 24].

The results of the present study showed that one subject (number 24) received the antidepressant sertraline at a dose of 50 mg once daily. In this subject the genotype was T/T and the plasma Z-END concentration 3.05 ng/mL. Up to date, there is still contradictory evidence whether or not the use of SSRI may influence TAM efficacy.

The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy [25] currently recommends to avoid the use of TAM in conjunction with moderate and strong CYP2D6 inhibitors in patients treated with TAM. In intermediate metabolizers of CYP2D6 (CYP2D6 IM), weak CYP2D6 inhibitors are also contra-indicated.

From the results of the present study it is apparent that the median Z-END concentration of genotype T/T of 3.76 ng/mL was below the Z-END MTC as set forth in the study of Madlensky *et al.*, (2011) [5]. To date it is unclear whether or not this Z-END MTC can affect TAM efficacy in BC patients in Indonesia, and how much is the target plasma Z-END concentration in the Indonesian population. Further studies are needed in this connection.

Several studies indicate that BC patients who have Z-END concentrations of < 5.9 ng/mL are at increased risk of recurrent BC [5, 26]. In connection with the target Z-END concentration, several studies escalated the TAM doses using as reference the CYP2D6 genotype or blood END concentrations. In subjects with decreased

activity i.e. the poor metabolizers (PM) or intermediate metabolizers (IM), the increase in the dose of 20 mg to 40 mg indicates increases in END concentrations without increasing the side effects [27-30]. Martinez de Duenas *et al.*, (2014) [31] increased the TAM doses from 20 mg to 40–60 mg in PM patients and could increase the END concentrations 2 to 3 times, comparable to those in excessive metabolizers (EM), but one subject (who used the TAM dose of 40 mg/day) dropped out of the study because of uterine hemorrhage from hyperplasia of endometrial polyps. In contrast with the study of Martinez de Duenas *et al.*, (2016) [31] who used the CYP2D6 genotype as reference for increasing the doses, the study conducted by Fox *et al.*, (2016) [32] supported the use of increased doses solely on the basis of plasma END concentrations without the need for performing CYP2D6 genotype assays.

The choice of germline sources for CYP2D6 genotyping may affect genotype frequency. In patients with BC it is known that there is chromosomal instability from deletion of alleles in chromosome 22q13, where the CYP2D6 gene is located [33]. The use of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) breast tumor tissues as germline material for the CYP2D6 genotype may result in misinterpretation of the data, due to the loss of heterozygosity at the CYP2D6 locus of the sample, so causing a deviation from the Hardy-Weinberg principle [34]. In the present study, the germline material was obtained from the blood, so that it is expected to cause no bias in the determination of the CYP2D6*10 genotypes.

The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy [25] currently recommends that in postmenopausal women with the CYP2D6 IM phenotype and the CYP2D6*10/*10 or CYP2D6*10/ alleles with decreased functioning, the use of alternative hormonal therapy (e.g. aromatase inhibitors/AI) should be considered, while in premenopausal women AI should be used in conjunction with suppression of ovarian function. In CYP2D6 IM, when AI is contra-indicated, the administration of TAM at a dose of 40 mg/day should be considered, which is the highest dose approved by the FDA and is known to increase END concentrations without increase in toxicity [25, 27].

The investigation of the CYP2D6*10 (c.100C>T) genotypes in this study also has its limitation, since ideally the study of genotypes should be performed on the whole CYP2D6 gene so that all existing variants may be known [4]. However, due to limited funds for this study the determination of genotypes could only be performed for one allele of high frequency in Asia, namely CYP2D6*10 (c.100C>T). There are several ways in which the results of this study may be confirmed, such as sequencing.

Apart from above-mentioned limitation, this study has as a plus point in the relatively large number of subjects (125 individuals). It is hoped that the results of this cross-sectional study may be used as baseline data for further and more conclusive studies.

This study only looked at polymorphisms of CYP2D6*10 (c.100C>T), while it has previously been known that the metabolism of TAM is complex. There is a need for studies to determine the role of genetic polymorphism of other P450 cytochromes isoforms (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19) and of glucuronyltransferases on Z-END concentration.

CONCLUSION

There was a significant association between CYP2D6*10 (c.100C>T) and attainment of plasma steady-state Z-END MTC in Indonesian breast cancer patients receiving TAM at a dose of 20 mg/day.

LIST OF ABBREVIATIONS

BC : breast cancer

C/C : wild type

C/T : heterozygous mutant

CYP2D6 : cytochrome P450 2D6

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

END : endoxifen

IM : intermediate metabolizer

MTC : minimal threshold concentration

PCR-RFLP : polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism

PM : poor metabolizer

Pro34Ser : proline 34 into serine

SGPT : serum glutamic pyruvic transaminase

TAM : tamoxifen

T/T : homozygous mutant

UPLC-MS/MS : ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Z-END : zusammen endoxifen

CONFLICT OF INTEREST

We hereby assure that the manuscript a) is an original work, b) has not been previously published in whole or in part, and c) is not under consideration for publication elsewhere. All authors have disclosed any actual or potential competing interest regarding the submitted article and the nature of those interests. All authors a) have read the manuscript, b) agree that the manuscript is ready for submission to a journal, and c) accept responsibility for the manuscript's contents.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the women in the study for their cooperation.

REFERENCES

- [1] Gradishar, W. J.; Anderson, B. O.; Balassanian, R.; Blair, S. L.; Burstein, H. J.; Cyr, A.; Elias, A. D.; Farrar, W. B.; Forero, A.; Giordano, S. H.; Goetz, M. P.; Goldstein, L. J.; Isakoff, S. J.; Lyons, J.; Marcom, P. K.; Mayer, I. A.; McCormick, B.; Moran, M. S.; O'Regan, R. M.; Patel, S. A.; Pierce, L. J.; Reed, E. C.; Salerno, K. E.; Schwartzberg, L. S.; Sitapati, A.; Smith, K. L.; Smith, M. L.; Soliman, H.; Somlo, G.; Telli, M. L.; Ward, J. H.; Kumar, R. and Shead, D. A. (2018) Breast Cancer, Version 4.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, **16**, 310-320.
- [2] Coates, A. S.; Winer, E. P.; Goldhirsch, A.; Gelber, R. D.; Gnant, M.; Piccart-Gebhart, M.; Thurlimann, B.; Senn, H. J. and Panel, M. (2015) Tailoring

- therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann. Oncol.*, **26**, 1533-46.
- [3] Purwanto, H.D.; Haryono, S.J.; Harahap, W.A., editors. Penatalaksanaan Kanker Payudara 2015 1st. ed. Jakarta: Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI), 2015.
- [4] Desta, Z.; Ward, B.A.; Soukhova, N.V. and Flockhart, D.A. (2004) Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 1062-1075.
- [5] Madlensky, L.; Natarajan, L.; Tchu, S.; Pu, M.; Mortimer, J.; Flatt, S.W.; Nikoloff, D.M.; Hillman, G.; Fontecha, M.R.; Lawrence, H.J.; Parker, B.A.; Wu, A.H. and Pierce, J.P. (2011) Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **89**, 718-725.
- [6] Fotoohi, A. K.; Karim, H.; Lafolie, P.; Pohanka, A.; Ostervall, J.; Hatschek, T. and Vitols, S. (2016) Pronounced Interindividual But Not Intraindividual Variation in Tamoxifen and Metabolite Levels in Plasma During Adjuvant Treatment of Women With Early Breast Cancer. *Ther. Drug. Monit.*, **38**, 239-245.
- [7] Lim, J. S.; Chen, X. A.; Singh, O.; Yap, Y. S.; Ng, R. C.; Wong, N. S.; Wong, M.; Lee, E. J. and Chowbay, B. (2011) Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **71**, 737-750.
- [8] Areepium, N.; Panomvana, D.; Rungwanonchai, P.; Sathaporn, S. and Voravud, N. (2013) Effects of CYP2D6 and UGT2B7 polymorphisms on pharmacokinetics of tamoxifen in Thai breast cancer patients. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, **5**, 73-78.
- [9] Bradford, L. D. (2002) CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*, **3**, 229-243.
- [10] Baclig, M. O.; Predicala, R. Z.; Mapua, C. A.; Lozano-Kuhne, J. P.; Daroy, M. L.; Natividad, F. F. and Javier, F. O. (2012) Allelic and genotype frequencies of catechol-O-methyltransferase (Val158Met) and CYP2D6*10 (Pro34Ser) single

- nucleotide polymorphisms in the Philippines. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, **3**, 115-121.
- [11] Lu, J.; Li, H.; Guo, P.; Shen, R.; Luo, Y.; Ge, Q.; Shi, W.; Li, Y. and Zhu, W. (2017) The effect of CYP2D6 *10 polymorphism on adjuvant tamoxifen in Asian breast cancer patients: a meta-analysis. *Onco. Targets. Ther.*, **10**, 5429-5437.
- [12] Hennig, E. E.; Piatkowska, M.; Karczmarski, J.; Goryca, K.; Brewczynska, E.; Jazwiec, R.; Kluska, A.; Omiotek, R.; Paziewska, A.; Dadlez, M. and Ostrowski, J. (2015) Limited predictive value of achieving beneficial plasma (Z)-endoxifen threshold level by CYP2D6 genotyping in tamoxifen-treated Polish women with breast cancer. *BMC Cancer*, **15**, 570.
- [13] Bagheri, A.; Kamalidehghan, B.; Haghshenas, M.; Azadfar, P.; Akbari, L.; Sangtarash, M. H.; Vejdandoust, F.; Ahmadipour, F.; Meng, G. Y. and Houshmand, M. (2015) Prevalence of the CYP2D6*10 (C100T), *4 (G1846A), and *14 (G1758A) alleles among Iranians of different ethnicities. *Drug. Des. Devel. Ther.*, **9**, 2627-2634.
- [14] Modaresi-Nejad, M.; Shiva, M. and Afsharian, P. (2015) Novel +90G>A Intronic Polymorphism of CYP2D6. *Cell. J.*, **17**, 83-88.
- [15] Lei, L.; Wang, X.; Wu, X. D.; Wang, Z.; Chen, Z. H.; Zheng, Y. B. and Wang, X. J. (2016) Association of CYP2D6*10 (c.100C>T) polymorphisms with clinical outcome of breast cancer after tamoxifen adjuvant endocrine therapy in Chinese population. *Am. J. Transl. Res.*, **8**, 3585-3592.
- [16] Kiyotani, K.; Mushiroda, T.; Imamura, C. K.; Hosono, N.; Tsunoda, T.; Kubo, M.; Tanigawara, Y.; Flockhart, D. A.; Desta, Z.; Skaar, T. C.; Aki, F.; Hirata, K.; Takatsuka, Y.; Okazaki, M.; Ohsumi, S.; Yamakawa, T.; Sasa, M.; Nakamura, Y. and Zembutsu, H. (2010) Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, **28**, 1287-1293.
- [17] Love, R. R.; Desta, Z.; Flockhart, D.; Skaar, T.; Ogburn, E. T.; Ramamoorthy, A.; Uy, G. B.; Laudico, A. V.; Van Dinh, N.; Quang le, H.; Van To, T.; Young, G. S.; Hade, E. and Jarjoura, D. (2013) CYP2D6 genotypes, endoxifen levels, and disease recurrence in 224 Filipino and Vietnamese women receiving adjuvant tamoxifen for operable breast cancer. *Springerplus.*, **2**, 52.

- [18] Katzenellenbogen, B. S.; Norman, M. J.; Eckert, R. L.; Peltz, S. W. and Mangel, W. F. (1984) Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **44**, 112-119.
- [19]. Jin, Y.; Desta, Z.; Stearns, V.; Ward, B.; Ho, H.; Lee, K. H.; Skaar, T.; Storniolo, A. M.; Li, L.; Araba, A.; Blanchard, R.; Nguyen, A.; Ullmer, L.; Hayden, J.; Lemler, S.; Weinshilboum, R. M.; Rae, J. M.; Hayes, D. F. and Flockhart, D. A. (2005) CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J. Natl. Cancer.*, **97**, 30-39.
- [20] Binkhorst, L.; Mathijssen, R. H.; van Herk-Sukel, M. P.; Bannink, M.; Jager, A.; Wiemer, E. A. and van Gelder, T. (2013) Unjustified prescribing of CYP2D6 inhibiting SSRIs in women treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.*, **139**, 923-929.
- [21] Binkhorst, L.; van Gelder, T.; Loos, W. J.; de Jongh, F. E.; Hamberg, P.; Moghaddam-Helmantel, I. M.; de Jonge, E.; Jager, A.; Seynaeve, C.; van Schaik, R. H.; Verweij, J. and Mathijssen, R. H. (2012) Effects of CYP induction by rifampicin on tamoxifen exposure. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **92**, 62-67.
- [22] Binkhorst, L.; Mathijssen, R. H.; Jager, A. and van Gelder, T. (2015) Individualization of tamoxifen therapy: much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treat. Rev.*, **41**, 289-299.
- [23] Borges, S.; Li, L.; Hamman, M. A.; Jones, D. R.; Hall, S. D. and Gorski, J. C. (2005) Dextromethorphan to dextrorphan urinary metabolic ratio does not reflect dextromethorphan oral clearance. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1052-1055.
- [24] Stearns, V.; Johnson, M.; Rae, J.; Morocho, A.; Novielli, A.; Bhargava, P.; Hayes, D.; Desta, Z. and Flockhart, D. (2003) Active Tamoxifen Metabolite Plasma Concentrations After Coadministration of Tamoxifen and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 1758-1764.
- [25] Goetz, M. P.; Sangkuhl, K.; Guchelaar, H. J.; Schwab, M.; Province, M.; Whirl-Carrillo, M.; Symmans, W. F.; McLeod, H. L.; Ratain, M. J.; Zembutsu, H.; Gaedigk, A.; van Schaik, R. H.; Ingle, J. N.; Caudle, K. E. and Klein, T. E. (2018) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **103**, 770-777.

- [26] Saladores, P.; Murdter, T.; Eccles, D.; Chowbay, B.; Zgheib, N. K.; Winter, S.; Ganchev, B.; Eccles, B.; Gerty, S.; Tfayli, A.; Lim, J. S.; Yap, Y. S.; Ng, R. C.; Wong, N. S.; Dent, R.; Habbal, M. Z.; Schaeffeler, E.; Eichelbaum, M.; Schroth, W.; Schwab, M. and Brauch, H. (2015) Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.*, **15**, 84-94.
- [27] Hertz, D. L.; Deal, A.; Ibrahim, J. G.; Walko, C. M.; Weck, K. E.; Anderson, S.; Magrinat, G.; Olajide, O.; Moore, S.; Raab, R.; Carrizosa, D. R.; Corso, S.; Schwartz, G.; Graham, M.; Peppercorn, J. M.; Jones, D. R.; Desta, Z.; Flockhart, D. A.; Evans, J. P.; McLeod, H. L.; Carey, L. A. and Irvin, W. J., Jr. (2016) Tamoxifen Dose Escalation in Patients With Diminished CYP2D6 Activity Normalizes Endoxifen Concentrations Without Increasing Toxicity. *Oncologist.*, **21**, 795-803.
- [28] Kiyotani, K.; Mushiroda, T.; Imamura, C. K.; Tanigawara, Y.; Hosono, N.; Kubo, M.; Sasa, M.; Nakamura, Y. and Zembutsu, H. (2012) Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, **131**, 137-145.
- [29] Irvin, W. J., Jr.; Walko, C. M.; Weck, K. E.; Ibrahim, J. G.; Chiu, W. K.; Dees, E. C.; Moore, S. G.; Olajide, O. A.; Graham, M. L.; Canale, S. T.; Raab, R. E.; Corso, S. W.; Peppercorn, J. M.; Anderson, S. M.; Friedman, K. J.; Ogburn, E. T.; Desta, Z.; Flockhart, D. A.; McLeod, H. L.; Evans, J. P. and Carey, L. A. (2011) Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J. Clin. Oncol.*, **29**, 3232-3239.
- [30] Welzen, M. E.; Dezentje, V. O.; van Schaik, R. H.; Colbers, A. P.; Guchelaar, H. J.; van Erp, N. P.; den Hartigh, J.; Burger, D. M. and van Laarhoven, H. W. (2015) The Effect of Tamoxifen Dose Increment in Patients With Impaired CYP2D6 Activity. *Ther. Drug Monit.*, **37**, 501-507.
- [31] Martinez de Duenas, E.; Ochoa Aranda, E.; Blancas Lopez-Barajas, I.; Ferrer Magdalena, T.; Bandres Moya, F.; Chicharro Garcia, L. M.; Gomez Capilla, J. A.; Zafra Ceres, M.; de Haro, T.; Romero Llorens, R.; Ferrer Albiach, C.; Ferriols Lisart, R.; Chover Lara, D.; Lopez Rodriguez, A.; Munarriz Ferrandis, J. and

Olmos Anton, S. (2014) Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Breast.*, **23**, 400-406.

[32] Fox, P.; Balleine, R. L.; Lee, C.; Gao, B.; Balakrishnar, B.; Menzies, A. M.; Yeap, S. H.; Ali, S. S.; Gebiski, V.; Provan, P.; Coulter, S.; Liddle, C.; Hui, R.; Kefford, R.; Lynch, J.; Wong, M.; Wilcken, N. and Gurney, H. (2016) Dose Escalation of Tamoxifen in Patients with Low Endoxifen Level: Evidence for Therapeutic Drug Monitoring-The TADE Study. *Clin. Cancer. Res.*, **22**, 3164-3171.

[33] Castells, A.; Gusella, J. F.; Ramesh, V. and Rustgi, A. K. (2000) A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res.*, **60**, 2836-2839.

[34] Goetz, M. P.; Sun, J. X.; Suman, V. J.; Silva, G. O.; Perou, C. M.; Nakamura, Y.; Cox, N. J.; Stephens, P. J.; Miller, V. A.; Ross, J. S.; Chen, D.; Safgren, S. L.; Kuffel, M. J.; Ames, M. M.; Kalari, K. R.; Gomez, H. L.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Burgues, O.; Brauch, H. B.; Ingle, J. N.; Ratain, M. J. and Yelensky, R. (2014) Loss of heterozygosity at the CYP2D6 locus in breast cancer: implications for germline pharmacogenetic studies. *J. Natl. Cancer Inst.*, **107**

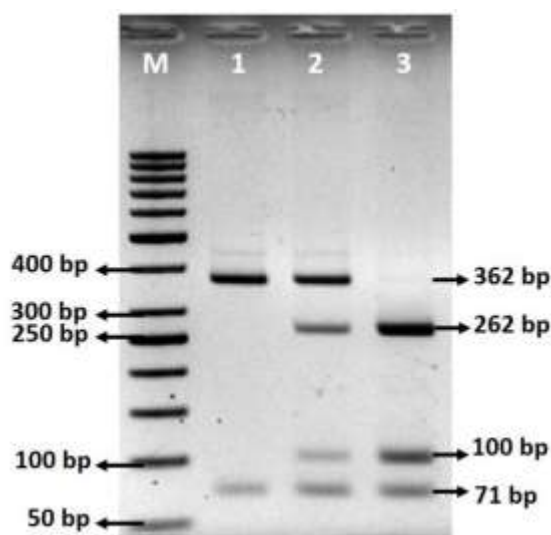


Figure 1. PCR RFLP Results for the CYP2D6*10 Gene (c.100C>T) by means of HphI

The results of electrophoresis on 2.5% agarose (100 V, 35 minutes) stained with 8% ethidium bromide. The sample in lane 1 is the homozygous wild-type C/C genotype (362 bp and 71 bp), the sample in lane 2 is the heterozygous mutant C/T

(362 bp, 262 bp, 100 bp, 71 bp), and the sample in lane 3 is the homozygous mutant T/T (262 bp, 100 bp, 71 bp). M is a 50 bp marker.

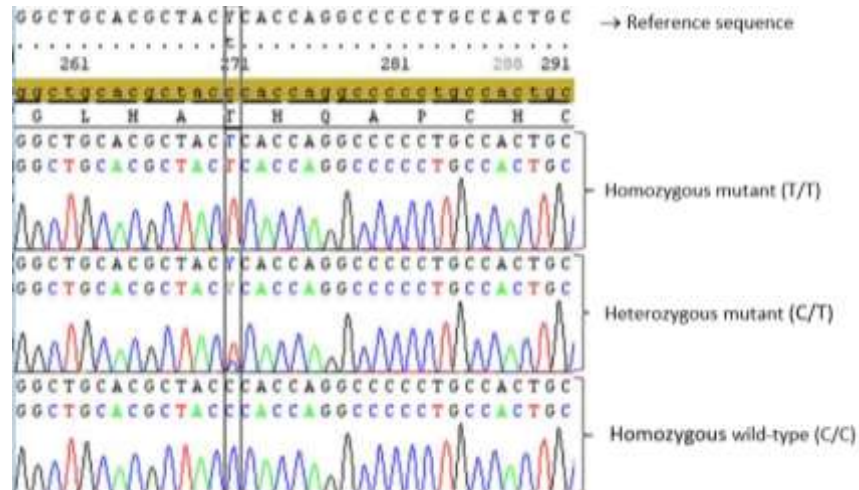


Figure 2. Sequencing results of three samples with different CYP2D6*10 genotypes

The PCR sequencing result was 433 bp in size. The mutation point was located at base number 270. The homozygous mutant (T/T) had the base T, the heterozygous mutant (C/T) had the bases C or T (Y), and the homozygous wild-type (C/C) had the base C.



Figure 3. Sequencing results of five negative PCR samples

The PCR sequencing results were 503 bp in size using the primers of Moderasi-nejad et al.14. Subjects No. 26, 33, 52, 103, and 119 had base C at the position of base No. 271 of the PCR product.

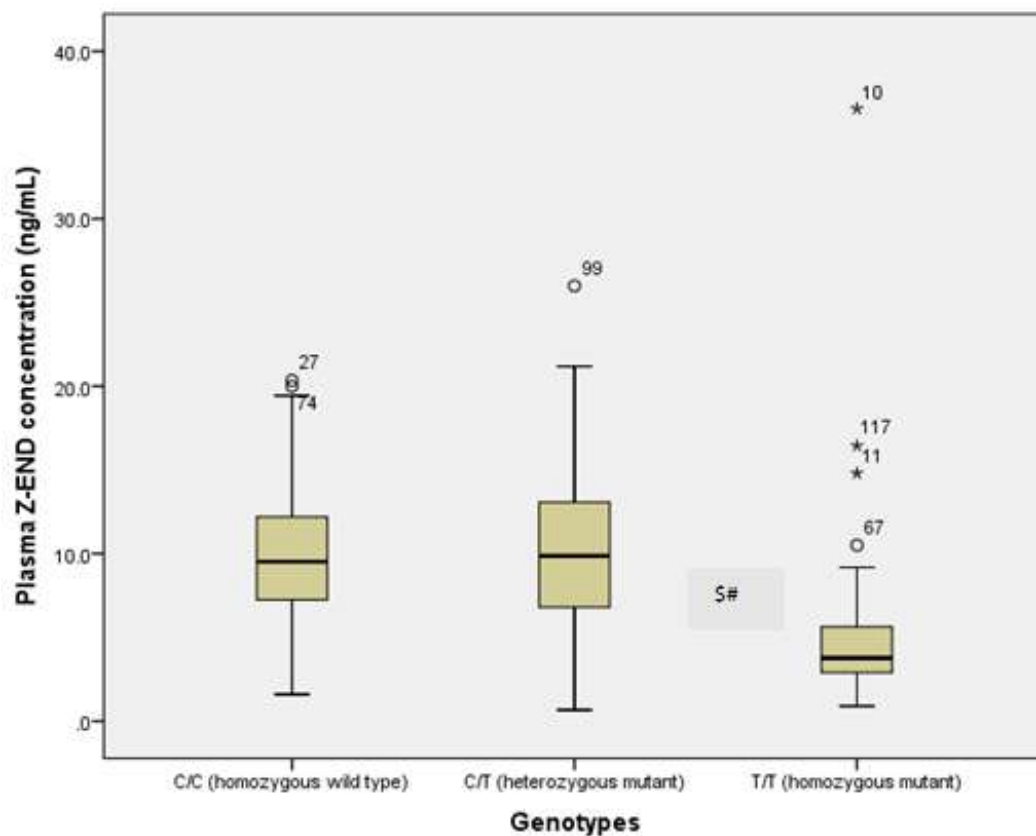


Figure 4. Median Z-END concentration of CYP2D6*10 genotypes

§ Mann Whitney test: C/C vs. T/T ($p < 0.001$); #C/T vs. T/T ($p < 0.001$)

RIWAYAT HIDUP

Nama : Yenny
 Tempat, tanggal lahir : Pekanbaru, 17 Desember 1974
 Jenis Kelamin : Perempuan
 Agama : Katholik
 Pekerjaan : Dosen Tetap Universitas Trisakti
 Pangkat/Golongan : Lektor Kepala/IV-a
 Pekerjaan : Kepala Bagian Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti
Associate editor Jurnal Universa Medicina
 Alamat : Jl. Muara Karang blok Q8 timur no.38
 Plut Penjaringan, Jakarta Utara (14450)

Email : yenfarmako@gmail.com
 Status : Menikah
 Suami : Saimon Effendy, S.E., M.M., M.H.
 Anak : Sherry Effendy

Riwayat Pendidikan

2016–sekarang Peserta Program Pendidikan S3 Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
 Lulus 2009 Program Pendidikan Spesialis Farmakologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
 Lulus 2002 Program Pendidikan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti
 Lulus 1993 Sekolah Menengah Atas Santa Maria, Pekanbaru, Riau
 Lulus 1990 Sekolah Menengah Pertama Santa Maria, Pekanbaru, Riau
 Lulus 1987 Sekolah Dasar Santa Maria, Pekanbaru, Riau

Keanggotaan Organisasi Profesi

2009–Sekarang : Anggota Perhimpunan Dokter Spesialis Farmakologi Klinik (PERDAFKI)
 2017–2020 : Wakil Bendahara Kolegium Farmakologi Klinik

Penghargaan

- Karya Ilmiah Hasil Pemikiran Terbaik Kedua Tingkat Universitas Trisakti Tahun Akademik 2009/2010: Pharmacokinetic Interaction Between Rifampicin and Efavirenz in HIV-TB Coinfections
- Karya Ilmiah Hasil Pemikiran Terbaik Tingkat Universitas Trisakti Tahun Akademik 2009/2010: Pleiotropic Effects of Statin in Stroke Prevention
- Karya Ilmiah Hasil Penelitian Terbaik Tingkat Universitas Trisakti Tahun Akademik 2010/2011: Multimicronutrient Supplementation in Older Persons Decreased Zinc Deficiency but Not Serum TNF alpha

Daftar Karya Ilmiah

- Efek Schizandrine C terhadap kerusakan hati akibat pemberian parasetamol pada tikus. Univ Med 2005;24:161–6
- Aflatoksin dan aflatoksikosis pada manusia. Univ Med 2006;25: 41–52
- Prevalensi penyakit kronis dan kualitas hidup pada lanjut usia di Jakarta Selatan. Univ Med 2006;25:164–171
- Resistensi dari bakteri enteric: aspek global terhadap antimikroba. Univ Med 2007;26: 46–56.
- Prevalence of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae*. Univ Med 2008;27:98–105.
- The role of polyphenols in causing cardiovascular disease. Univ Med 2008;27:29–38.
- The benefits and risks of Echinachea in treatment of common cold and influenza. Univ Med 2008;27:132–142
- Thiazolidinedione and cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus. Univ Med 2008;27:183–93.
- Reaksi hipersensitivitas terhadap obat sulfonamid dan antiinflamasi nonsteroid . Majalah Farmakologi dan Terapi Indonesia 2008;15:29–36.
- Pleiotropic effects of statins in stroke prevention. Univ Med 2009;28:117–25.
- Pharmacokinetic Interaction efavirenz and Rifampicin in healthy volunteers. Int J Clin Pharmacol Ther 2011;49:162–8.
- Warfarin: do we need genotype-based dose prediction? Univ Med 2010;29:135–7.
- Micronutrien supplementation in older persons decreased zinc deficiency but not serum TNF- α . Univ Med 2011;30:102–10
- High dose simvastatin and adverse muscle effects. Univ Med 2011;30:135–207
- Does aspirin have a role in preventing unprovoked recurrent thromboembolism? Univ Med 2013;32:1–2
- Isoflavon supplementation reduce low density lipoprotein cholesterol level in postmenopause womens. Univ Med 2013;32:197–207

- Effect of soy isoflavone supplementation on endothelial dysfunction and oxidative stress in equol-producing postmenopausal women. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15:71–9.