

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**POLA EKSPRESI PVRL-1 DAN IRF6
PADA PENDERITA *CLEFT LIP AND PALATE***

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D	0004095603
Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS.	0008035803
Regina Purnama Dewi Iskandar, drg., M.Imun.	011817017344

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

November 2018

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)



POLA EKSPRESI PVRL-1 DAN IRF6
PADA PENDERITA *CLEFT LIP AND PALATE*

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D	0004095603
Prof. Dr. Chairul Anwar Nidom, drh., MS.	0008035803
Regina Purnama Dewi Iskandar, drg., M.Imun.	011817017344

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA

November 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pola Ekspresi PVRL-1 dan IRF6 pada Penderita Cleft Lip and Palate

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : SRI AGUS SUDJARWO,
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0004095603
 Jabatan Fungsional : Guru Besar
 Program Studi : Sains Veteriner
 Nomor HP : 085645000684
 Alamat surel (e-mail) : ags158@yahoo.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. Dr. drh. CHAIRUL ANWAR NIDOM M.Si
 NIDN : 0008035803
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Regina Purnama Dewi Iskandar, drg.
 NIDN :
 Perguruan Tinggi :
Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : Universitas Airlangga
 Alamat : Jalan Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya
 Penanggung Jawab : Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000

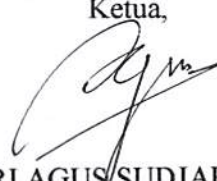
Mengetahui,
 Direktur Sekolah Pascasarjana UNAIR



(Prof. Dr. Sri Iswati, SE., M.Si, Ak)
 NIP/NIK 196311211991032001

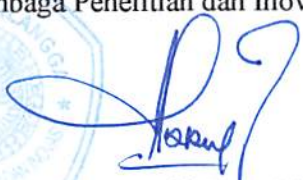


Kota Surabaya, 21 - 11 - 2018
 Ketua,

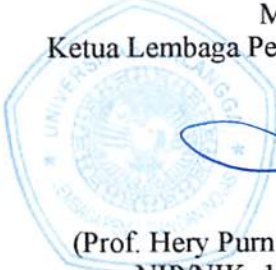


(SRI AGUS SUDJARWO,)
 NIP/NIK 195609041984031004

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR



(Prof. Hery Purnobasuki, Drs., MSi., Ph.D)
 NIP/NIK 196705071991021001




RINGKASAN

Celah orofasial merupakan anomali kongenital yang sering terjadi dengan etiologi multifaktorial. Pada umumnya kelainan ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan yang memicu terjadinya defek genetik, dan secara klinis menimbulkan deformitas wajah. Pada data nasional tercatat bahwa prevalensi CLP di Indonesia sebesar 0,2%. Pada tahun 2012 organisasi internasional Pusat Pelatihan Celah Bibir menyatakan peningkatan kasus CLP sekitar 7500 kasus per tahun di Indonesia. Penderita CLP yang terdaftar pada Yayasan CLP Surabaya berjumlah 1257 pasien. *Cleft Lip and Palate* (CLP) paling banyak terjadi pada ras Asia dan keturunan Indian di Amerika, yaitu satu kasus dari 500 kelahiran.

Cleft Lip and Palate (CLP) merupakan hasil dari gangguan pembentukan bibir pada minggu ke-4 sampai ke-7 pada masa embryogenesis. Adanya gangguan pada proses tersebut menyebabkan celah pada bibir dan/atau palatum. Keluhan yang banyak ditemukan pada penderita CLP adalah adanya problem pengunyahan, infeksi telinga yang rekuren, maloklusi dan gangguan fonetik, sehingga dibutuhkan perawatan multidisiplin dari bidang obstetrik, pediatri bedah plastik, rehabilitasi, dan kedokteran gigi. Faktor lingkungan pada masa kehamilan yang berpengaruh pada proses palatogenesis adalah infeksi pada ibu hamil, usia ibu yang lebih dari 40 tahun saat hamil, defisiensi nutrisi, paparan bahan teratogenik saat masa kehamilan, dan kebiasaan merokok, baik aktif maupun pasif. Terjadinya CLP karena faktor genetik merupakan akibat dari ekspresi berbagai gen yang diduga memiliki peran terhadap palatogenesis, antara lain: TBX22, PVRL1, dan IRF6, tetapi hasil tersebut dapat berbeda, dipengaruhi oleh lokasi geografis, etnis dan ras.

Pada penelitian ini dikembangkan pemeriksaan imunogenetik menggunakan spesimen saliva. Saliva merupakan refleksi dari kondisi sistemik tubuh, tidak terbatas pada keadaan di rongga mulut. Penelitian mengenai *cleft lip and palate* sudah banyak dilakukan di Indonesia,

akan tetapi belum memberikan pemahaman yang mendalam tentang pola ekspresi protein dari PVRL1 dan IRF6. Berdasar hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk menjawab permasalahan yang mendasari terjadinya CLP di Indonesia.

PRAKATA

Alhamdulillah, Puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat-Nya, sehingga penelitian tentang ekspresi protein PVRL-1 dan IRF6 pada penderita *cleft lip and palate* (CLP) dapat dilaksanakan. Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., AK., CMA selaku Rektor Universitas Airlangga.
3. Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D selaku Ketua LPPM Universitas Airlangga.
4. Prof. Dr. Hj. Sri Iswati, SE., M.Si., AK., selaku direktur Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga
5. Dr. Agung Dwi Wahyu Widodo, dr., M.Si., M.Ked.Klin., Sp.MK, selaku Koordinator Program Studi (KPS) S2 Imunologi Universitas Airlangga
6. Prof. Dr. Djohansjah Marzoeki, dr., Sp.B., Sp.BP-RE(K), selaku Ketua Yayasan *Cleft Lip and Palate Center* Surabaya
7. Staff *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga yang membantu proses penelitian.
8. Semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Peneliti menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu peneliti membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun untuk pengembangan penelitian ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informais kepada masyarakat banyak.

Surabaya, November 2018

Peneliti.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Sampul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Ringkasan.....	iii
Prakata.....	v
Daftar Isi.....	vi
Daftar Tabel.....	viii
Daftar Gambar.....	ix
Daftar Lampiran.....	x
BAB 1: PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
BAB 2: TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Cleft Lip and Palate</i> (CLP).....	6
2.1.1 Etiologi CLP.....	6
2.1.1.1 Faktor Genetik.....	7
2.1.1.2 Faktor Non-genetik.....	8
2.1.2 Klasifikasi CLP.....	10
2.1.3 Epidemiologi CLP.....	10
2.1.4 Komplikasi CLP.....	11
2.2 PVRL-1.....	12
2.3 IRF6.....	13
BAB 3: TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	14
3.1 Tujuan Penelitian.....	14
3.2 Manfaat Penelitian.....	14
3.2.1 Manfaat Teoritis.....	14
3.2.1 Manfaat Klinis.....	14
BAB 4: METODE PENELITIAN.....	15
4.1 Tempat Penelitian.....	15
4.2 Waktu Penelitian.....	15
4.3 Alat dan Bahan Penelitian.....	15
4.4 Tahapan Penelitian.....	15
4.4.1 Persiapan Subjek.....	16
4.4.2 Pengambilan Spesimen.....	16
4.4.3 Penanganan Spesimen.....	17
4.4.4 Persiapan Sampel.....	18
4.4.5 Uji dot blot.....	18
4.4.6 Persiapan gel.....	19
4.4.7 Karakterisasi SDS-PAGE.....	20
4.4.8 Elektrotransfer.....	22
4.4.9 Inkubasi Antibodi dan <i>Blocking</i>	23

BAB 5: HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	24
5.1 Hasil yang Dicapai.....	24
5.2 Luaran yang Dicapai.....	31
BAB 6: RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	32
BAB 7: KESIMPULAN DAN SARAN	33
7.1 Kesimpulan.....	33
7.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 :	Klasifikasi CLP berdasarkan Davis & Ritchie.....	9
Tabel 2.2 :	Klasifikasi CLP berdasarkan Veau.....	10
Tabel 5.1 :	Keterangan untuk Gambar 5.2	25
Tabel 5.2 :	Rerata nilai Rf.....	26
Tabel 5.3 :	Rerata Berat Molekul Protein.....	28
Tabel 5.4 :	Keterangan untuk Gambar 5.5.....	29
Tabel 5.5 :	Rerata intensitas protein dengan kisaran berat molekul 45-65 kDa yang diduga sebagai target protein IRF6.....	29
Tabel 5.6 :	Rerata intensitas protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa yang diduga sebagai target protein PVRL1.....	30
Tabel 5.7 :	Rerata intensitas protein dengan kisaran berat molekul 15-20 kDa.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 :	Klasifikasi CLP berdasarkan Davis & Ritcie.....	9
Gambar 2.2 :	Klasifikasi Celah Palatum berdasarkan Veau.....	10
Gambar 2.3 :	Diagram Konstruksi SDS-PAGE diskontinyu.....	18
Gambar 4.1 :	Antibodi primer yang digunakan untuk metode dot-blot.....	19
Gambar 4.2 :	Proses persiapan Gel. (A) Pembuatan <i>separating gel</i> , (B) pembuatan <i>stacking gel</i>	19
Gambar 4.3 :	Proses SDS-PAGE.....	20
Gambar 4.4 :	Proses <i>staining</i> dan <i>destaining</i>	21
Gambar 4.5 :	Contoh hasil teknik SDS-PAGE.....	21
Gambar 4.6 :	Dokumentasi gel menggunakan Gel-doc.....	22
Gambar 5.1 :	Hasil positif dari uji <i>dot-blot</i> untuk target protein: IRF6 (A) dan PVRL1 (B).....	24
Gambar 5.2 :	Pita Analisis Rf dari Hasil SDS-PAGE.....	25
Gambar 5.3 :	Nilai Rf dari Uji SDS-PAGE.....	25
Gambar 5.4 :	Analisis Berat Molekul Protein dari Hasil SDS-PAGE	27
Gambar 5.5 :	Profil Protein Menggunakan Gel 12 % SDS-PAGE pada Setiap Kelompok.....	29
Gambar 5.6 :	Profil pita protein dengan kisaran berat molekul 45-65 kDa yang diduga sebagai target protein IRF6.....	29
Gambar 5.7 :	Profil pita protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa yang diduga sebagai PVRL1	30
Gambar 5.9 :	Profil pita protein dengan kisaran berat molekul 15-20 kDa.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 : Sertifikat Laik Etik
Lampiran 2 : *Draft* Artikel Ilmiah
Lampiran 3 : Status *submission*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Celah orofasial merupakan anomali kongenital yang sering terjadi dengan etiologi multifaktorial (Ladeira *and* Alonso, 2012). Pada umumnya kelainan ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan yang memicu terjadinya defek genetik (Kaewkhampa *et al.*, 2012). Celah orofasial mengakibatkan deformitas wajah yang terdiri dari celah bibir (*cheiloschisis*), celah palatum (*palatoschisis*), atau kombinasi keduanya (*cleft lip and palate / CLP*) (Leslie *et al.*, 2016).

Penderita yang ditemukan selama ini berbeda, dipengaruhi oleh lokasi geografis, etnis dan ras (Cooper *et al.* 2006). Sebagaimana dilaporkan oleh Sozen *et al.* (2008), ditemukan sekitar dua kasus *Cleft lip* dan/atau *palate* (CLP) dari 1000 kelahiran bayi di seluruh dunia.

Menurut Tobing (2017), data nasional mencatat bahwa prevalensi CLP di Indonesia sebesar 0,2%. Pada tahun 2012 organisasi internasional Pusat Pelatihan Celah Bibir menyatakan peningkatan kasus CLP sekitar 7500 kasus per tahun di Indonesia (Kembaren, 2012). Sementara itu di RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado dilaporkan terdapat 60 kasus CLP dalam kurun waktu Januari 2011 – Oktober 2012 (Loho, 2013). Penderita CLP yang terdaftar pada Yayasan CLP Surabaya berjumlah 1257 pasien (Reswan, 2006).

Cleft Lip and Palate (CLP) paling banyak terjadi pada ras Asia dan keturunan Indian di Amerika, yaitu satu kasus dari 500 kelahiran. Pada ras Kaukasia, didapatkan satu kasus CLP dari 1000 kelahiran. Ras Afrika-Amerika mempunyai resiko paling rendah untuk menderita CLP, yaitu satu kasus dari 2000 kelahiran (Supit dan Prasetyono, 2008). Di regional Asia Tenggara, didapatkan prevalensi CLP sebesar 1,54 dari 1000 bayi yang lahir di Filipina (Cooper *et al.*, 2006).

Cleft Lip and Palate (CLP) merupakan hasil dari gangguan pembentukan bibir pada minggu ke-4 sampai ke-7 pada masa embriogenesis, dan dilanjutkan dengan perkembangan palatum pada minggu ke-7 kehamilan. Adanya gangguan pada proses tersebut menyebabkan celah pada bibir dan/atau palatum (Leslie *et al.*, 2016). Keluhan yang banyak ditemukan pada penderita CLP adalah adanya problem pengunyahan, infeksi telinga yang rekuren, maloklusi dan gangguan fonetik, sehingga dibutuhkan perawatan multidisiplin dari bidang obstetri, pediatri bedah plastik, rehabilitasi, dan kedokteran gigi (Giaquinto-Cilliers *et al.*, 2013).

Posisi organ yang terganggu pada kasus CLP adalah bibir atas, *alveolar ridge*, palatum durum, palatum molle, hidung, dan mata (Istiyana dkk, 2016). Pada umumnya penderita *Cleft lip* dan/atau *palate* mengalami celah bibir bersamaan dengan celah langit-langit, tetapi hanya sekitar 5% kasus celah bibir yang terjadi tanpa disertai celah langit-langit (Sianita dan Alawiyah, 2011). Berdasarkan jenis kelamin, celah bibir lebih banyak terjadi pada laki-laki dibandingkan perempuan dengan rasio 2:1, sedangkan celah palatum lebih banyak terjadi pada perempuan dibanding laki – laki dengan rasio 2:1 (Dixon *et al.*, 2011).

Faktor lingkungan pada masa kehamilan yang berpengaruh pada proses palatogenesis adalah infeksi pada ibu hamil, usia ibu yang lebih dari 40 tahun saat hamil, defisiensi nutrisi, paparan bahan teratogenik saat masa kehamilan, dan kebiasaan merokok, baik aktif maupun pasif (Lopes *et al.*, 2014). Terjadinya CLP karena faktor genetik merupakan akibat dari ekspresi berbagai gen yang diduga memiliki peran terhadap palatogenesis, antara lain: *MSX1 (muscle segment homeobox 1)* (Cuddapah *et al.*, 2016); *TBX22 (T-box transcription factor 22)*, (Kaewkhampa *et al.*, 2012); *PVRL1 (poliovirus receptor-like 1)* (Shu *et al.*, 2015); *p63 (tumor protein 63)*, *FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1)* (Dixon *et al.*, 2011); dan *IRF6 (interferon regulatory factor 6)* (Kerameddin *et al.*, 2015). Beberapa literatur menyebutkan telah ditemukan ekspresi HLA (*human leukocyte antigen*) yang meningkat pada penderita CLP dibandingkan dengan kelompok yang tidak menderita CLP (Inoyatov *et al.*, 2012). Dari

berbagai gen tersebut, gen yang paling sering mengalami mutasi dan berperan penting terjadinya CLP adalah *PVRL1* (Scapoli *et al.*, 2006) dan *IRF6* (Kerameddin *et al.*, 2015).

PVRL1 atau disebut juga *Nectin1* adalah protein *receptor-like* yang memiliki struktur mirip dengan immunoglobulin (Avila *et al.*, 2006). Fungsi dari *PVRL1* adalah untuk perlekatan antar sel epitel. Pada proses pembentukan palatum di periode embrional, penyatuan *palatal shelves* terbentuk setelah terjadi fusi dari jaringan epitel di palatum. Proses tersebut sangat dipengaruhi oleh *PVRL1*, sehingga mutasi *PVRL1* memiliki keterkaitan dengan terjadinya CLP (Shu *et al.*, 2015). Fungsi lain dari *PVRL1* adalah sebagai reseptor virus herpes. Infeksi yang terjadi selama masa kehamilan dapat meningkatkan resiko terjadinya CLP pada janin (Avila *et al.*, 2006).

Interferon Regulating Factor 6 (*IRF6*) merupakan faktor transkripsi yang diduga berperan pada perkembangan struktur orofasial (Wu-Chou *et al.*, 2013). Faktor transkripsi adalah protein yang meregulasi proses transkripsi suatu gen. *IRF6* banyak terekspresi di sisi median dari *palatal shelves* sebelum dan selama terjadinya fusi saat palatogenesis. Ekspresi *IRF6* juga ditemukan di folikel rambut, rugae palatina, benih gigi, dan kulit. *IRF6* menyebabkan hiperproliferasi epidermis sehingga terjadi kegagalan diferensiasi sel. Kondisi ini mengakibatkan adhesi antar epitel semakin banyak yang mengakibatkan CLP (Gurramkonda *et al.*, 2017).

IRF6 terletak pada kromosom 1 dan merupakan kandidat gen yang berperan terhadap terjadinya CLP yang terdiri dari 10 ekson (Gurramkonda *et al.*, 2017). Zhou *et al.* (2013) menyatakan bahwa terdapat kaitan antara *IRF6* dengan terjadinya CLP. *IRF6* diduga mengakibatkan perubahan asam amino posisi 274 dari valin menjadi isoleusin (V274I). Perubahan asam amino tersebut ditemukan di penderita CLP pada populasi Asia dan Amerika-Indian. Menurut Park *et al.* (2007), ekspresi *IRF6* meningkatkan resiko terjadinya CLP pada populasi penderita CLP di Korea Selatan. Hasil yang berbeda didapatkan oleh Pegelow *et al.*

(2008) yang menyatakan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara ekspresi IRF6 dengan terjadinya CLP pada populasi penderita CLP di Swedia. Perbedaan hasil tersebut diduga terkait dengan kondisi geografis dan ras penderita, sehingga pada penelitian ini dipilih populasi penderita CLP yang terdaftar di Surabaya *Cleft Lip and Palate Centre* sebagai subjek penelitian.

Sampai saat ini masih terjadi perdebatan mengenai adanya hubungan antara mutasi PVRL1 terhadap terjadinya CLP, meskipun berbagai literatur menyebutkan bahwa mutasi PVRL1 merupakan faktor resiko terjadinya CLP. Kondisi tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Shu *et al.*, (2015) yang menyatakan bahwa mutasi PVRL1 lebih sering terjadi pada populasi penderita CLP di benua Eropa, Amerika Utara dan Amerika Selatan dibandingkan dengan penderita CLP di benua Asia. Mutasi PVRL1 yang ditemukan pada penderita di benua Asia berbeda di beberapa negara. Pada populasi penderita CLP di Filipina ditemukan mutasi PVRL1 di exon 2 dan 6, pada populasi Thailand ditemukan mutasi pada exon 6. Pada populasi penderita CLP di Jepang tidak didapatkan hasil mutasi PVRL1 yang signifikan, sedangkan pada populasi penderita CLP di Taiwan dan Cina tidak didapatkan mutasi PVRL1.

Analisis genetik menyediakan informasi profil molekuler dan perubahan yang terjadi pada tingkat RNA, tetapi informasi mengenai proses modulasi fungsi dan aktivitas protein, seperti perubahan pada proses post-translasi tidak bisa didapatkan dari analisis RNA. Oleh karena itu, diperlukan data mengenai profil protein antara plasma normal dengan penderita *cleft lip and palate* sebagai penunjang analisis genomik. Protein tersebut merupakan hasil dari proses translasi, post-translasi, dan post-transkripsi yang berdampak baik secara langsung maupun tidak langsung terhadap berbagai proses biologis (Ahrens *et al.*, 2010). Terdapat lebih dari satu juta tipe protein yang terdapat pada sel, jaringan, dan cairan tubuh, tapi profil protein

antar individu bervariasi tergantung dari kondisi fisiologis, fase diferensiasi sel, serta perubahan lainnya sebagai respons terhadap perubahan lingkungan (Barbosa *et al.*, 2012).

Penelitian mengenai *cleft lip and palate* sudah banyak dilakukan di Indonesia, akan tetapi belum memberikan pemahaman yang mendalam tentang pola profil protein penderita CLP dan ekspresi protein PVRL1 dan IRF6 pada penderita CLP. Berdasar hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk menjawab permasalahan yang mendasari terjadinya CLP di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perbedaan profil protein dan berat molekul antara penderita CLP dengan orang normal?
2. Apakah terdapat peningkatan ekspresi protein PVRL1 pada penderita *cleft lip and palate*?
3. Apakah terdapat peningkatan ekspresi protein IRF6 pada penderita *cleft lip and palate*?
4. Apakah terdapat perbedaan nilai migrasi relatif protein (Rf) antara penderita CLP dengan orang normal?



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Cleft Lip and Palate*

CLP adalah keadaan bibir dan palatum yang terpisah, sehingga terdapat celah di antara bibir dan palatum karena adanya kegagalan perkembangan embrio di dalam kandungan. Jika celah tersebut hanya melibatkan bibir, disebut *labioschisis*. Perkembangan palatum merupakan sekuens yang kompleks, dimulai dari terbentuknya *palatal shelves* yang berasal dari prosesus maksilaris pada minggu keenam embryogenesis. Gangguan yang terjadi pada proses tersebut menyebabkan kegagalan penyatuan palatum (Marcano *et al.*, 2004). Jika celah melibatkan palatum, maka disebut *palatoschisis*. CLP merupakan malformasi kongenital yang paling sering terjadi, dan kondisi ini disebabkan oleh faktor genetik dan pengaruh faktor lingkungan (Agbenorku, 2013).

2.1.1 Etiologi CLP

Sampai saat ini etiologi dari CLP belum bisa diidentifikasi secara pasti, namun ada beberapa faktor yang memengaruhi terjadinya CLP, yaitu faktor genetik dan faktor lingkungan yang bersifat teratogenik sehingga berdampak pada perkembangan embrio di dalam kandungan (Shkoukani *et al.*, 2013).

2.1.1.1 Faktor Genetik

Pengaruh faktor genetik pada perkembangan terjadinya CLP pertama kali ditemukan oleh Fogh-Anderson, dengan pola herediter yang bervariasi (Marcano *et al.*, 2004). CLP bisa terjadi sebagai salah satu manifestasi dari sindrom sistemik, seperti trisomi 13, *amniotic band*

anomalad, sindrom Fryns, sindrom Meckel, sindrom Stickler, sindrom Treacher Collins, sindrom van der Woude, sindrom Velocardiofacial, dan lain-lain. Namun, CLP juga bisa terjadi tanpa disertai adanya sindrom-sindrom sistemik tersebut (Agbenorku, 2013).

Dari hasil penelusuran literatur, telah diidentifikasi adanya mutasi dari gen tertentu yang berperan pada proses terjadinya CLP (Jiang *et al.*, 2012). Gen-gen tersebut antara lain: IRF6 (*interferon regulatory factor 6*), MSX1 (*muscle segment homeobox 1*), TBX22 (*T-box transcription factor 22*), dan PVRL1 (*poliovirus receptor-like 1*) (Shu *et al.*, 2015). Dari berbagai gen tersebut, gen yang paling sering mengalami mutasi sehingga berperan pada terjadinya CLP adalah TBX22 (Marcano *et al.*, 2004) dan PVRL1 (Scapoli *et al.*, 2006).

2.1.1.2 Faktor Non-Genetik

Selain faktor genetik, terjadinya CLP juga dipengaruhi oleh faktor non-genetik atau faktor lingkungan. Faktor lingkungan tersebut dapat diidentifikasi dan dicegah melalui konsultasi prenatal mengenai faktor resiko terjadinya CLP, dan konseling genetik (Lopes *et al.*, 2014).

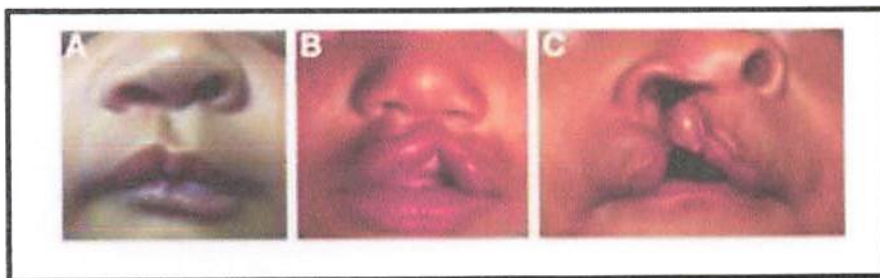
Terdapat berbagai macam faktor lingkungan pada masa kehamilan yang bisa memicu terjadinya CLP, antara lain: kebiasaan merokok (baik sebagai perokok aktif maupun pasif) dan konsumsi minuman beralkohol, kualitas diet ibu hamil, asupan asam folat, paparan terhadap bahan kimia dan kontaminan, usia kehamilan, infeksi, diabetes, berat badan ibu yang terlalu tinggi atau rendah, dan konsumsi obat-obatan selama masa kehamilan (Neves *et al.*, 2015). Orang tua yang berusia lebih dari 40 tahun, beresiko sekitar 50% lebih tinggi untuk memiliki anak yang menderita CLP daripada pasangan orang tua dengan usia lebih muda dari 40 tahun (Herkrath *et al.*, 2014). Ibu hamil yang memiliki kebiasaan merokok ataupun yang selalu terpapar asap rokok memiliki resiko 2 kali lebih tinggi untuk melahirkan bayi dengan kondisi

CLP (Martelli *et al.*, 2015). Mekanisme hubungan antara kebiasaan merokok dengan terjadinya CLP masih belum diketahui secara mendalam, tetapi kondisi tersebut diduga karena merokok berpotensi menimbulkan modifikasi *transforming growth factor alpha* (TGF- α). Janin yang membawa TGF- α yang termodifikasi tersebut dilaporkan lebih rentan menderita CLP. Efek lain dari kebiasaan merokok pada ibu hamil adalah resiko terjadinya mutasi pada gen yang meregulasi proses detoksifikasi sehingga tubuh tidak bisa mengeliminasi efek toksik tembakau (Radojicic *et al.*, 2006).

Bahan kimia dapat bersifat teratogenik, sehingga berperan dalam terjadinya CLP. Bahan kimia tersebut antara lain terkandung dalam obat-obatan, di antaranya: asam valporat, antikonvulsan, derivat asam retinoat, thalidomide, phenytoin, dan antibiotik. CLP juga bisa terjadi karena kualitas diet yang rendah selama masa kehamilan, antara lain karena defisiensi vitamin, defisiensi asam folat, iritasi intrauterin, dan infeksi selama masa kehamilan. Asam folat sangat dianjurkan untuk wanita dalam rentang usia reproduksi aktif untuk menghindari terjadinya defek pada *neural tube*, dinding abdomen, dan mengurangi resiko CLP (Jagomagi *et al.*, 2010).

2.1.2 Klasifikasi CLP

Klasifikasi CLP pada umumnya berdasarkan gambaran klinisnya yang bervariasi dari defek yang paling kecil hingga celah komplit yang melibatkan tulang alveolar dan palatum. Celah bibir (*cleft lip*) dibagi menjadi tiga jenis yaitu: tipe mikroform, tipe inkomplit, dan tipe komplit yang melibatkan tulang alveolar (Shkoukani *et al.*, 2013).



Gambar 2.1: Klasifikasi CLP berdasarkan Davis & Ritchie
(A) tipe mikroform, (B) tipe inkomplit, (C) tipe komplit (Shah *et al.*, 2015)

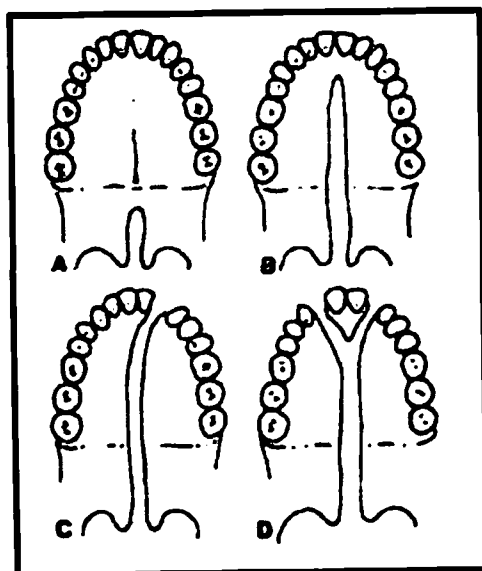
Celah yang terdapat pada palatum durum dan/atau palatum molle masih dapat tertutup oleh mukosa. Kondisi tersebut dinamakan *submucous cleft palate*, yang pada pemeriksaan klinis akan terdapat gambaran segitiga berwarna kebiruan setelah celah pada palatum lunak. Gambaran tersebut menunjukkan adanya celah pada tulang palatum di bawah mukosa. Celah palatum tersebut dapat berbentuk menyerupai huruf V dan huruf U (Singh *et al.*, 2015). Terdapat beberapa klasifikasi celah langit-langit (*cleft palate*). Klasifikasi yang paling sering digunakan adalah menurut Veau dan menurut Davis dan Ritchie (Singh *et al.*, 2015). Klasifikasi menurut Davis dan Ritchie membagi celah ke dalam tiga kelompok berdasarkan posisi celah tersebut dan relasinya terhadap prosesus alveolaris (Shah *et al.*, 2015).

Tabel 2.1: Klasifikasi celah palatum berdasarkan Davis dan Ritchie (Shah *et al.*, 2015)

Tipe I	Tipe II	Tipe III
Celah pre-aveolar	Celah Post-Alveolaris	Celah Alveolaris
Celah bibir unilateral	Celah palatum keras	Celah alveolaris unilateral
Celah bibir bilateral	Celah palatum lunak	Celah alveolaris bilateral
Celah bibir medial	Celah palatum keras dan lunak	Celah alveolaris medial
	Celah submukosa	

Tabel 2.2: Klasifikasi celah palatum berdasarkan Veau (Shah *et al.*, 2015)

Tipe I (A)	Defek hanya terdapat pada palatum lunak
Tipe II (B)	Defek melibatkan palatum keras, palatum lunak, tetapi tanpa melibatkan foramen insisivus
Tipe III (C)	Celah unilateral komplit. Celah memanjang dari palatum lunak, tulang alveolar, hingga melibatkan bibir.
Tipe IV (D)	Celah bilateral komplit. Sama seperti tipe III, tetapi melibatkan kedua sisi (bilateral)

Gambar 2.2: Klasifikasi celah palatum berdasarkan Veau (Shah *et al.*, 2015)

2.1.3 Epidemiologi CLP

Prevalensi CLP berkisar antara 1:500 hingga 1 : 2500 kelahiran tergantung dari wilayah geografis, ras, suku, dan kondisi sosial-ekonomi penderita (Sozen *et al.*, 2008). Prevalensi terjadinya CLP yang tertinggi adalah pada wilayah Asia dengan rasio 14 : 10.000 kelahiran, diikuti dengan ras Kaukasoid dengan rasio 10 : 10.000 kelahiran, ras Afrika-Amerika dengan rasio 4 : 10.000 kelahiran. Terdapat rata-rata 700 kasus kelahiran bayi yang mengalami CLP di Amerika setiap tahunnya (Agbenorku, 2013).

Celah bibir dan palatum lebih banyak terjadi pada laki-laki dibandingkan perempuan dengan rasio 2:1. Berdasarkan lokasinya, celah tersebut lebih sering terjadi di sebelah kiri wajah dibandingkan kanan dengan rasio 2:1. Predileksi lokasi tersebut diperkirakan karena perkembangan arteri fasialis kiri yang lebih lambat dibandingkan arteri fasialis kanan (Shkoukani *et al.*, 2013).

Resiko terjadinya CLP meningkat pada keluarga yang salah satu anggotanya menderita CLP. Jika di dalam suatu keluarga memiliki anak yang menderita CLP, maka anak selanjutnya beresiko 2-5% lebih tinggi untuk terkena CLP dibandingkan dengan keluarga yang tidak memiliki riwayat terjadinya CLP. Resiko terjadinya CLP semakin tinggi jika dalam keluarga tersebut memiliki lebih dari satu anggota keluarga yang mengalami CLP, yaitu 10-12% lebih beresiko. Apabila terdapat riwayat sindrom sistemik yang menyebabkan manifestasi CLP pada suatu keluarga, maka resiko menjadi 50% lebih tinggi menderita CLP daripada individu tanpa riwayat sindrom sistemik. (Agbenorku, 2013).

Menurut Tobing (2017), data nasional mencatat bahwa prevalensi CLP di Indonesia sebesar 0,2%. Pada tahun 2012 organisasi internasional Pusat Pelatihan Celah Bibir menyatakan peningkatan kasus CLP sekitar 7500 kasus per tahun di Indonesia (Kembaren, 2012). Sementara itu di RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado dilaporkan terdapat 60 kasus CLP dalam kurun waktu Januari 2011 – Oktober 2012 (Loho, 2013). Penderita CLP yang terdaftar pada Yayasan CLP Surabaya berjumlah 1257 pasien (Reswan, 2006).

2.1.4 Komplikasi CLP

Komplikasi yang dialami oleh penderita CLP antara lain: gangguan estetik, gangguan pengunyahan, proses menelan, nasal regurgitasi, gangguan pendengaran, gangguan bicara, masalah, infeksi telinga rekuren, dan maloklusi. Dilaporkan bahwa orang tua dari penderita

CLP mengalami gangguan psikososial setelah mengetahui bahwa anaknya menderita CLP (Agbenorku, 2013).

Penatalaksanaan dari CLP memerlukan intervensi multidisiplin ilmu. Terapi wicara diperlukan untuk mengoreksi gangguan fonetik karena adanya defek otot. Seiring bertambahnya usia, penderita juga memerlukan terapi orotodonsia supaya didapatkan oklusi yang harmonis, serta memerlukan terapi bedah (Ifzah *et al.*, 2016).

2.2 PVRL1 (Polio Virus Receptor –like- 1)

Fungsi dari PVRL1 adalah untuk perlekatan antar sel-sel epitel. Pada proses pembentukan palatum di periode embrional, penyatuan *palatal shelves* terbentuk setelah terjadi fusi dari jaringan epitel di palatum. Proses tersebut sangat dipengaruhi oleh PVRL1, sehingga mutasi PVRL1 memiliki keterkaitan dengan terjadinya CLP (Shu *et al.*, 2015). Fungsi lain dari PVRL1 adalah sebagai reseptor virus herpes. Infeksi yang terjadi selama masa kehamilan dapat meningkatkan resiko terjadinya CLP pada janin (Avila *et al.*, 2006).

Produk protein dari PVRL1 adalah *poliovirus receptor-related protein* (PRR) yang berfungsi sebagai molekul adhesi antar sel. Ekspresi PVRL1 berada di jaringan epitel median dari *palatal shelves*, dan epitel permukaan kulit (Kohli and Kohli, 2012). PVRL1 mampu melakukan *coding* terhadap Nectin-1 yang merupakan protein transmembran yang berfungsi molekul adhesi antar sel (Rahimov *et al.*, 2012).

Mutasi PVRL1 lebih sering terjadi pada populasi penderita CLP di benua Eropa, Amerika Utara dan Amerika Selatan dibandingkan dengan penderita CLP di benua Asia. Mutasi PVRL1 yang ditemukan pada penderita di benua Asia berbeda di beberapa negara. Pada populasi penderita CLP di Filipina ditemukan mutasi PVRL1 di exon 2 dan 6, pada populasi Thailand ditemukan mutasi pada exon 6. Pada populasi penderita CLP di Jepang tidak

didapatkan hasil mutasi PVRL1 yang signifikan, sedangkan pada populasi penderita CLP di Taiwan dan Cina tidak didapatkan mutasi PVRL1 (Shu *et al.*, 2015).

2.3 IRF6 (*Interferon Regulatory Factor-6*)

Kelompok faktor transkripsi *Interferon Regulatory Factor* (IRF) terdiri dari IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6. Pada awalnya IRF diketahui berfungsi untuk regulasi respons interferon pada infeksi virus, tetapi pada perkembangannya IRF diduga berperan juga pada tahap perkembangan embrio dan keganasan (Joly *et al.*, 2016). IRF1 dan IRF2 diperlukan untuk perkembangan sel NK. IRF4 dan IRF8 terlibat dalam diferensiasi sel B, serta perkembangan sel mieloid dan sel dendrit. IRF3, IRF5, dan IRF7 berperan pada regulasi respons imun *innate*, dan aktivasi jalur *Toll-like receptor* (Li *et al.*, 2011). IRF6 terletak pada kromosom 1, dan merupakan salah satu gen yang terkait dengan CLP. Gen IRF6 terdiri dari 10 exon, 3 di antaranya yaitu exon 1, 2, dan 10 bersifat *non-coding*. IRF6 memberikan kode terhadap 517 asam amino, memiliki domain *N-terminal winged-helix DNA-binding*, dan domain C terminal SMIR (*Smad-Interferon Regulatory Factor-binding*) (Gurramkonda *et al.*, 2017).

Eksresi IRF6 ditemukan di berbagai bagian tubuh yaitu: plasenta, ginjal, hepar, keratinosit, dan sel-sel epitel terutama epitel rongga mulut. Pada sel keratinosit, IRF6 terlibat pada *feedback loop* dengan p63 untuk meregulasi diferensiasi epidermis dan migrasi keratinosit (Biggs *et al.*, 2014). Pada tahap perkembangan embrio, terjadi peningkatan ekspresi IRF6 saat fase adhesi dan fusi kedua *palatal shelves* ketika proses palatogenesis. Pada hewan coba yang mengekspresikan IRF6 dalam jumlah yang sedikit mengakibatkan anomali orofasial, ekstremitas, dan epidermis (Joly *et al.*, 2016). Zhou *et al.* (2013) menyatakan bahwa variasi dari IRF6 merupakan salah satu faktor etiologi dari CLP.

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis perbedaan profil protein dan berat molekul antara penderita CLP dengan orang normal.
2. Menganalisis peningkatan ekspresi protein PVRL1 pada penderita *cleft lip and palate*.
3. Menganalisis peningkatan ekspresi protein IRF6 pada penderita *cleft lip and palate*.
4. Menganalisis perbedaan nilai Rf yang signifikan antara kelompok penderita CLP dan kelompok kontrol.

3.2 Manfaat Penelitian

3.2.1 Manfaat Teoritis

Memberikan kontribusi keilmuan dalam mengungkap peran imunogenetik terhadap patogenesis terjadinya kasus *cleft lip and palate*.

3.2.2 Manfaat Klinis

Dengan ditemukannya ekspresi protein PVRL1 dan IRF6 pada proses terjadinya *cleft lip and palate*, dapat dijadikan sebagai biomarker untuk deteksi dini dan upaya preventif CLP pada kelompok masyarakat yang berisiko menderita CLP.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Penelitian

1. Pengambilan spesimen dilakukan di Yayasan Cleft Lip and Palate Center Surabaya
2. Analisis Laboratorium dilakukan di Laboratorium HIV dan Laboratorium Toxoplasma, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga.

4.2 Waktu Penelitian

Januari 2018 – November 2018.

4.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi: *dry plate*, inkubator, pipet, *comb*, elektroforator, *power supply*, kertas saring, membran PDVF, spons, *glass plate*, *transfer apparatus*, elektroda, *shaker*, sampel, marker, larutan *buffer*, H₂O, gel, reagen AP, reagen TEMED, skim milk 5%, antibodi primer, antibodi sekunder, bovine serum albumin, campuran ECL.

4.4 Tahapan Penelitian

Spesimen diambil dari darah dan saliva penderita *cleft lip and palate* setelah mendapat *informed consent* dari keluarga penderita. Darah sebanyak 7 cc dimasukkan ke dalam tabung centrifuge untuk mendapatkan plasma, kemudian di-vortex dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit.

4.4.1 Persiapan Subjek Penelitian

Pasien dan keluarga dari pasien yang memenuhi kriteria inklusi sampel diberi penjelasan terlebih dahulu mengenai tujuan penelitian dan metode pemeriksaan yang akan dilakukan. Jika pasien dan keluarganya paham dan setuju akan prosedur yang akan dilakukan, maka diminta untuk menandatangani lembar *informed consent*. Dalam penelitian ini, sampel yang akan diambil berupa sediaan darah dan saliva dari penderita *cleft lip and palate* (CLP) yang terdaftar di Yayasan *Cleft Lip and Palate Centre* Surabaya.

Penjelasan yang akan diberikan kepada pasien dan keluarganya menurut Nijhawan *et al.* (2016) meliputi: (1) Peneliti dan petugas yang mengambil spesimen memperkenalkan diri kepada pasien dan keluarganya, lalu dicek apakah pasien tersebut cocok dengan identitas yang ada di rekam medis/formulir laboratorium. (2) Menanyakan apakah pasien pernah menderita alergi. (3) Kesiediaan pasien untuk dilakukan pengambilan dan pemeriksaan sampel. (4) Tujuan dan urgensi penelitian. (5) Jenis sediaan yang akan diambil beserta pertimbangan menggunakan sediaan tersebut. (6) Penjelasan singkat mengenai teknik pengambilan dan pemeriksaan sampel di laboratorium. (7) Potensi risiko dari tindakan. (8) Menanyakan apakah pasien memiliki pertanyaan mengenai prosedur yang akan dilakukan.

4.4.2 Pengambilan Spesimen

Spesimen berupa sediaan *whole blood* diambil dari pasien CLP. Sebelum spesimen diambil, perlu dipersiapkan peralatan yang akan digunakan terlebih dahulu. Peralatan yang dibutuhkan meliputi: tabung yang mempunyai tutup untuk menampung darah beserta label, *bleeding pack* jika volume darah yang diambil banyak, sarung tangan, *tourniquet*, peralatan pengambilan darah, *alcohol hand rub*, *swab* alkohol 70% untuk desinfeksi kulit, *cotton-wool*

ball untuk menekan daerah insersi jarum, dan wadah untuk membawa sampel darah menuju laboratorium.

Tahapan pengambilan spesimen darah dari pasien: petugas mencuci tangan terlebih dahulu menggunakan air, sabun, dan bila perlu menggunakan *alcohol rub*. Ditentukan lokasi vena di area fossa antecubital serta memasang tourniquet sejauh 5-10 cm di atas tempat insersi jarum. Area kulit di sekitar lokasi insersi jarum dibersihkan terlebih dahulu menggunakan *alcohol swab* 70% selama 30 detik dan tunggu hingga mengering. Penggunaan alkohol lebih disarankan untuk desinfeksi daripada povidone iodine karena povidone iodine dapat meningkatkan kadar potassium, asam fosfat atau asam urat dalam darah ketika dilakukan tes laboratorium. Setelah itu petugas melakukan fiksasi dengan cara menggenggam lengan pasien. Jarum diinsersikan dengan sudut $\leq 30^\circ$ kemudian darah diambil sesuai volume yang dibutuhkan. *Tourniquet* dilepas terlebih dahulu sebelum jarum dikeluarkan. Kemudian jarum ditarik perlahan sambil menekan daerah insersi menggunakan kassa. Kemudian pasien diinstruksikan untuk menekan daerah insersi menggunakan kassa tersebut untuk menghentikan perdarahan dan tidak dibolehkan untuk menekuk lengan supaya tidak terjadi hematoma.

4.4.3 Penanganan Spesimen

Spesimen yang sudah diambil dan berada di dalam tabung yang sudah dicampur antikoagulan kemudian diberi label sesuai identitas pasien. Tabung tersebut digerak-gerakkan supaya spesimen darah bercampur dengan antikogulan. Spesimen kemudian disentrifus selama 12 menit dengan kecepatan 1350+/- 150 rcf (sesuai anjuran pabrik) pada suhu ruang untuk mendapatkan plasma (Sun *et al.*, 2012).

Melalui proses tersebut akan didapatkan tiga lapisan (dari atas ke bawah): plasma, leukosit (*buffy coat*), dan eritrosit. Setelah itu plasma diambil menggunakan *disposable*

transfer pipette ke dalam *polypropylene centrifuge tube*. Plasma yang didapatkan kemudian di sentrifus kembali, sehingga terbentuk endapan *buffy coat* di bagian bawah tabung. Plasma dipisahkan dari *buffy coat*. Plasma kemudian diletakkan ke dalam tabung cryovial dan disimpan pada temperatur -80°C jika tidak segera dilakukan analisis (Durat *and* Sukesh, 2014).

4.4.4 Persiapan Sampel (Mahmood *and* Yang, 2012)

Volume protein pada setiap *well* ditentukan sebesar $50\ \mu\text{g}$. Konsentrasi yang digunakan ditentukan menggunakan rumus: $\text{konsentrasi} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}}$. Diberikan $5\ \mu\text{g}$ larutan *buffer* pada sampel. Volume dibuat sama sebesar $15\ \mu\text{L}$ dengan cara menambahkan H_2O . Sampel dipanaskan menggunakan *dry plate* pada suhu 100°C selama 5 menit.

4.4.5 Dot-Blot

Sampel yang terdilusi 10x, sebanyak $5\ \mu\text{l}$ sampel diteteskan pada membran nitroselulosa. Selanjutnya, membran diinkubasi pada 4°C selama 12 jam. Uji keberhasilan dot blot menggunakan staining CBB selama 5 menit dan destaining selama 30 menit. Membran nitroselulose kemudian diblocking dengan 5% skim milk low fat dalam PBS-T (Phospahte buffer saline – Tween) yang diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu, membran di cuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Antibodi primer dan sekunder disiapkan dengan perbandingan 1:5000 pada antibodi primer dan 1:200 pada antibodi sekunder dengan pelarut PBS.

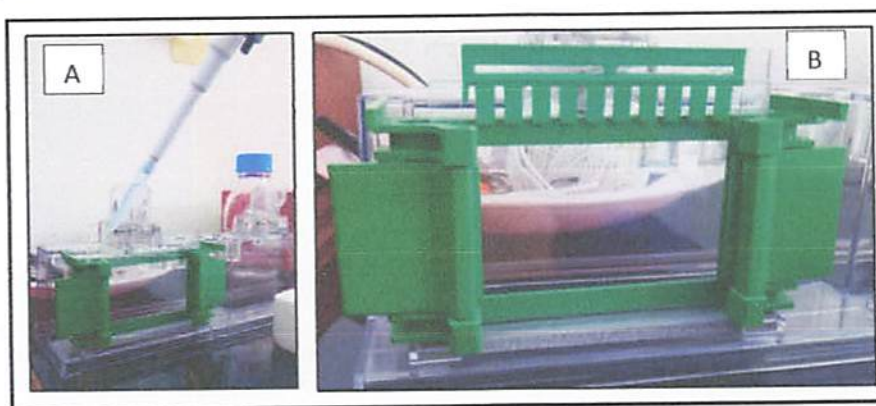
Membran direndam dalam 15 ml larutan selama 3 jam kemudian membran dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali. Sebanyak $500\ \mu\text{ TMB}$ diteteskan secara merata diatas membran kemudian di inkubasi selama 15 menit pada ruang gelap dan sebanyak $500\ \mu\text{l}$ stop solution diteteskan diatas membran. Hasil imuno – dot blotting discan untuk didokumentasi.



Gambar 4.1. Antibodi primer yang digunakan untuk metode dot-blot.

4.4.6 Persiapan Gel (Mahmood *and* Yang, 2012)

Setelah larutan *separating gel* 12% disiapkan, dilakukan solidifikasi gel menggunakan AP 10% dan TEMED. *Stacking gel* ditambahkan dengan menggunakan pipet hingga volumenya mencapai garis indikator pada *glass plate*, lalu diberi H₂O. Ditunggu selama 15-30 menit sampai konsistensi gel berubah menjadi lebih padat. Air dibuang lalu, masukkan *comb*, dan dipastikan tidak ada gelembung udara yang masih terjebak. Kemudian ditunggu hingga gel menjadi padat.



Gambar 4.2. Proses persiapan Gel. (A) Pembuatan *separating gel*, (B) pembuatan *stacking gel*.

4.4.7 Karakterisasi SDS-PAGE

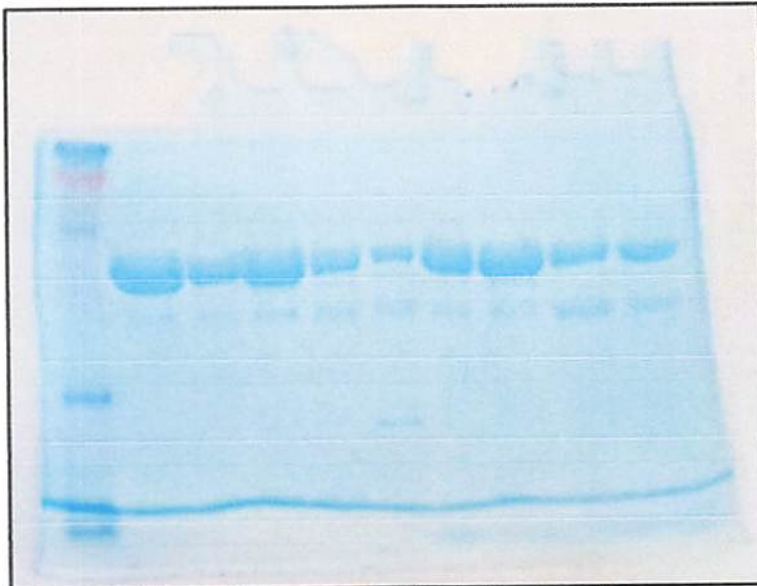
Serum yang terkoleksi dilakukan 10x dilusi menggunakan PBS 1x pH 8 (Phosphate buffer saline). Sampel kemudian dicampurkan dengan *laemmli buffer* dengan perbandingan 1:1 kemudian dipanaskan selama 15 detik dan langsung di dinginkan di freezer selama 10 menit. Sampel yang sudah siap kemudian di sebanyak 25 μ l dimasukkan kedalam sumur gel 12% SDS-Page (Szabo *et al.* 2012). Gel SDS-page dijalankan menggunakan alat Mini protean tetra (Bio-Rad) menggunakan buffer TGS pada kondisi 200 v selama 45 menit. Setelah selesai, gel diambil dari kaca (spacer) kemudian gel diletakkan di wadah untuk dilakukan pewarnaan dengan commasie brilian blue (CBB). Larutan CBB dituangkan kedalam wadah yang berisi gel, kemudian di inkubasi selama 15 menit dan secara bersamaan dishaker secara perlahan. Larutan CBB dibuang dan diganti dengan larutan destaining (H₂O, methanol, and acetic acid dengan ratio of 50/40/10) kemudian diinkubasi selama 1 jam hingga terlihat pita-pita protein. Dokumentasi hasil pewarnaan protein SDS-Page menggunakan geldoc EZ (Bio-Rad) dan analisis volume (int) protein menggunakan software imagelab 5.2.1.



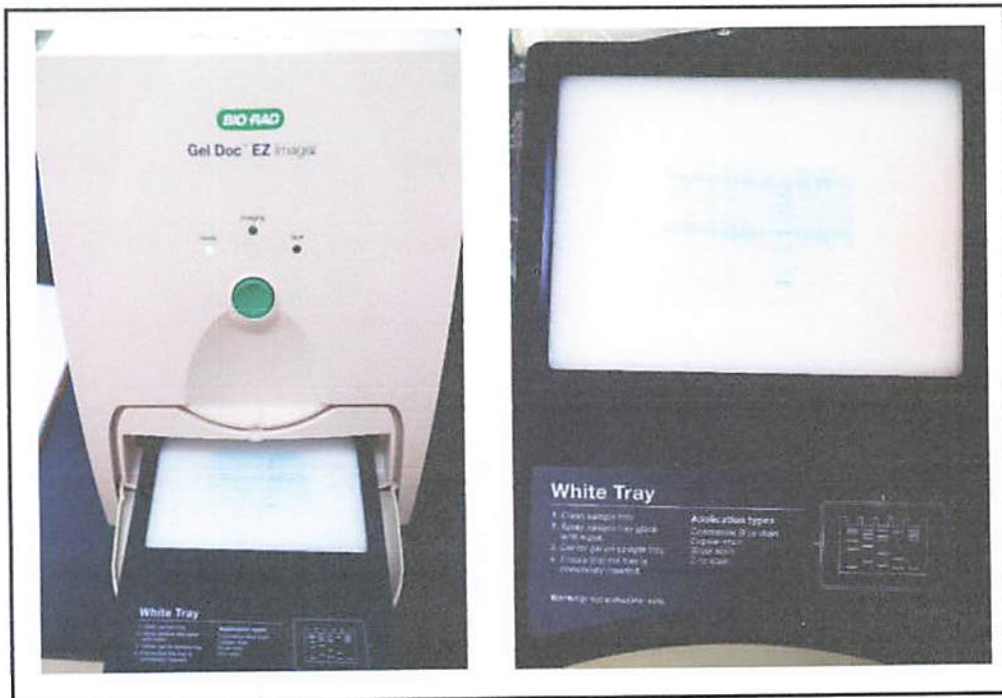
Gambar 4.3. Proses SDS-PAGE



Gambar 4.4. Proses *staining* dan *destaining*.



Gambar 4.5. Contoh hasil teknik SDS-PAGE.



Gambar 4.6. Dokumentasi gel menggunakan Gel-Doc.

4.4.8 Elektrotransfer (Mahmood *and* Yang, 2012)

Kertas saring dan membran polyvinylidene fluoride (PDVF) disiapkan sesuai dengan gel. Spons dan kertas saring dibasahi menggunakan *transfer buffer*. Membran PDVF dibasahi menggunakan metanol, dan *glass plate* dipisahkan dari gel. *Transfer sandwich* dilakukan dengan urutan: spons – 3 lembar kertas saring – gel PVDF – 3 lembar kertas saring. Pastikan bahwa tidak ada gelembung udara yang terjebak antara gel dengan membran PDVF. Cairan yang berlebih dibuang.

Sandwich dipindah ke *transfer apparatus* yang didinginkan pada suhu 4°C. Larutan *transfer buffer* ditambahkan ke *apparatus*, dan dipastikan bahwa *sandwich* sudah tertutup oleh *buffer*. Elektroda diletakkan pada sisi atas dari *sandwich*. Membran PDVF berada di antara gel dan elektroda positif. Proses transfer dilakukan selama 90 menit.

4.4.9 Inkubasi Antibodi dan *Blocking* (Mahmood and Yang, 2012)

Membran diblok menggunakan *skim milk* 5% pada TBST selama 1 jam. Antibodi primer ditambahkan pada bovine serum albumin (BSA) dan diinkubasi semalaman pada suhu 4°C di dalam *shaker*. Membran dan TBST dicuci selama 5 menit, diulangi sebanyak 3 kali. Proses pencucian dilakukan pada *shaker* menggunakan suhu ruang. Antibodi sekunder ditambahkan pada TBST dengan *skim milk* 5%, lalu diinkubasi selama 1 jam. Membran dicuci menggunakan TBST selama 5 menit, dan diulangi sebanyak 3 kali. Campuran ECL dipersiapkan menggunakan rasio antar larutan yang sudah ditentukan oleh pabrik. Membran kemudian diinkubasi selama 1-2 menit. Pada proses ini digunakan pipet 1000 μL supaya membran tertutupi dengan ECL. Hasil penelitian yang didapat kemudian diamati di ruang gelap.

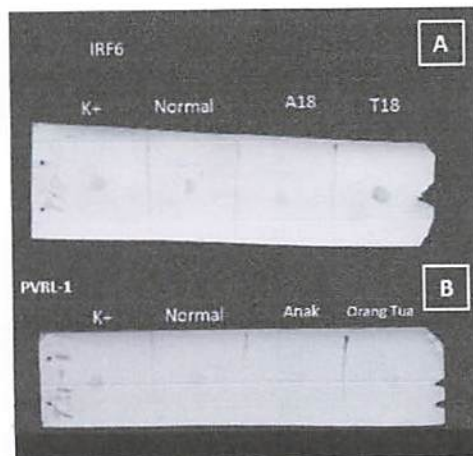
BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Hasil yang Dicapai

5.1.1 Uji Dot-Blot

Berdasarkan uji *dot-blot* didapatkan hasil positif dari target protein IRF6 dan PVRL1 pada kelompok anak, orang tua, dan kontrol seperti yang ditunjukkan oleh gambar 5.1. Hasil yang positif dapat diartikan bahwa terdapat ekspresi target protein PVRL1 dan IRF6 pada spesimen plasma dari setiap kelompok, sehingga dapat dilanjutkan dengan teknik SDS-PAGE untuk mengamati fragmentasi protein.

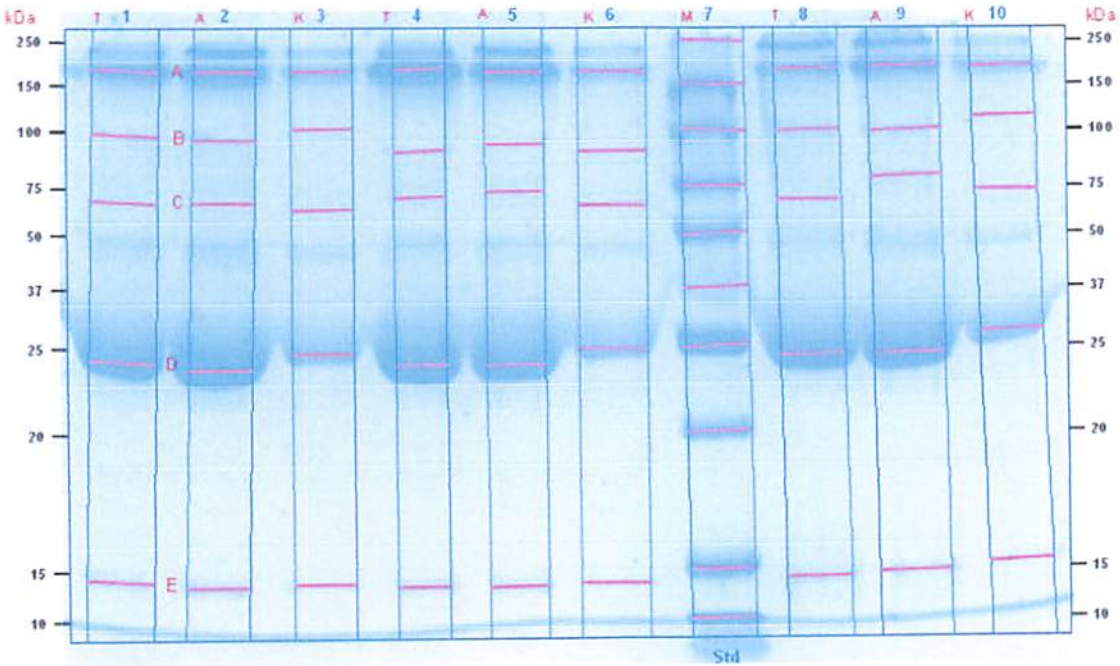


Gambar 5.1. Hasil positif dari uji *dot-blot* untuk target protein: IRF6 (A) dan PVRL1 (B).

5.1.2 Karakterisasi SDS-PAGE

Nilai Rf (*retardation factor*) menunjukkan pergerakan relatif protein terhadap gel. Nilai Rf ditentukan menggunakan rumus: (Rantam, 2003)

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

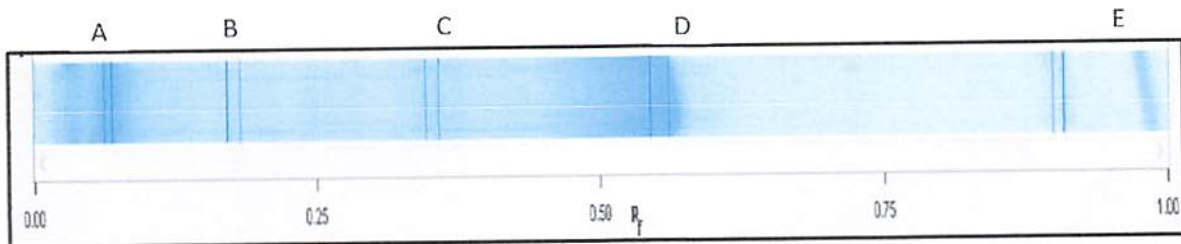


Gambar 5.2 Pita Analisis Rf dari hasil SDS-PAGE.

Tabel 5.1. Keterangan untuk gambar 5.2

Lane ke-...	Keterangan	Lane ke-...	Keterangan
1	Orang tua	6	Kontrol
2	Anak	7	Marker
3	Kontrol	8	Orang tua
4	Orang tua	9	Anak
5	Anak	10	Kontrol

Gambar 5.3 Nilai Rf dari hasil uji SDS-PAGE.



Gambar 5.3 Nilai Rf dari hasil uji SDS-PAGE.

Pada penelitian ini, nilai Rf pada pita A, B, C, D, E ditentukan dengan menggunakan analisis perangkat lunak ImageLab 5.2.1 (BioRad). Hasil rerata penghitungan nilai Rf ditampilkan pada tabel 5.1.

Tabel 5.2. Rerata nilai Rf

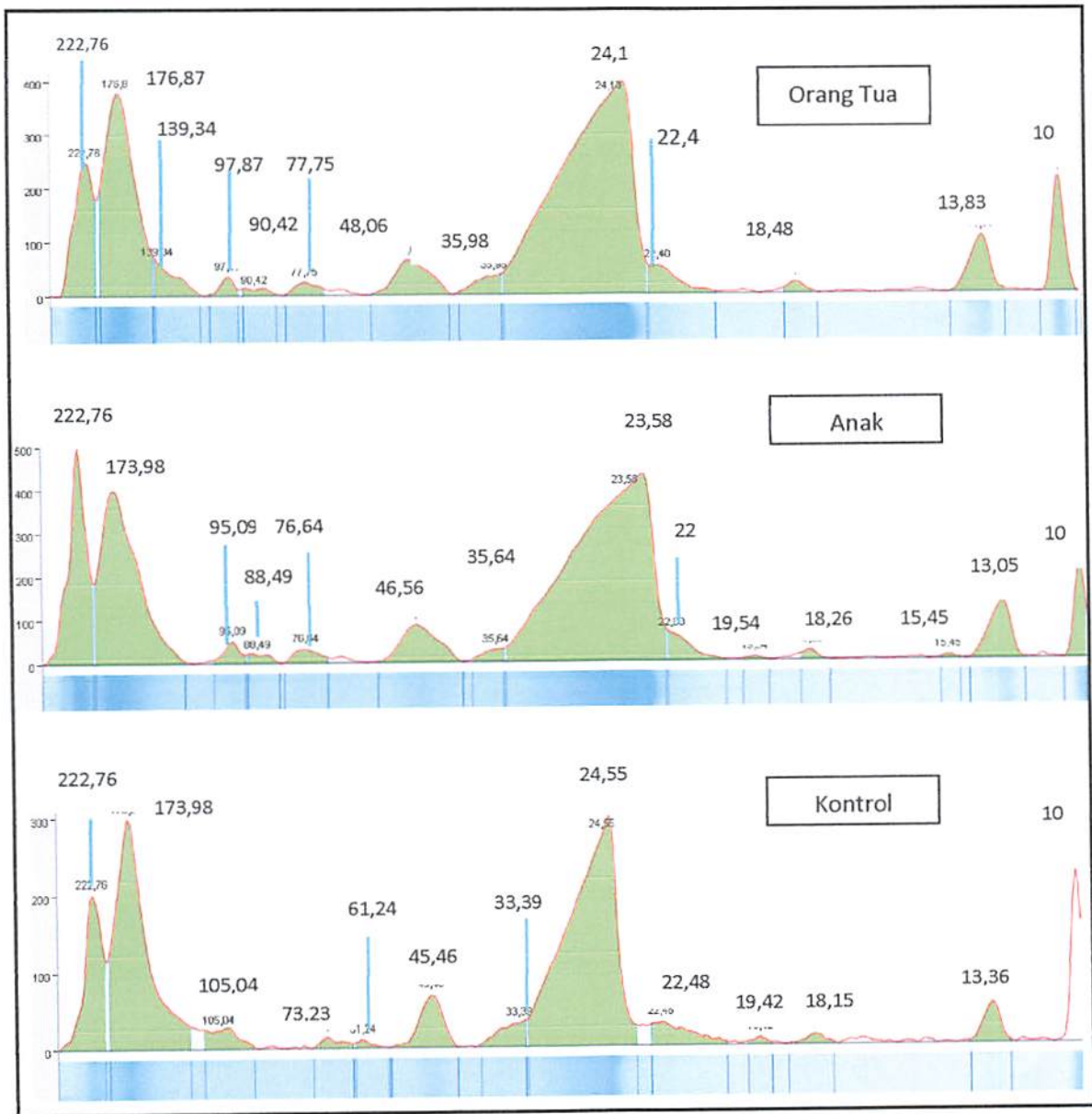
	Subjek					
	Orang Tua		Anak		Kontrol	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
Pita A*	0,063	0,01	0,064	0,01	0,072	0,01
Pita B	0,156	0,02	0,163	0,02	0,153	0,02
Pita C	0,339	0,02	0,345	0,02	0,352	0,02
Pita D*	0,518	0,02	0,534	0,02	0,505	0,02
Pita E	0,866	0,03	0,870	0,02	0,862	0,02

Berdasarkan uji analisis statistik, terdapat perbedaan nilai Rf yang signifikan pada pita

A ($p = 0,006$) dan pita D ($p = 0,000$) untuk $\alpha = 0,05$. Perbedaan yang tidak signifikan didapatkan pada pita B ($p = 0,377$), C ($p = 0,124$), dan E ($p = 0,433$).

5.1.3 Analisis Berat Molekul Protein

Berat molekul pada penelitian ini ditentukan melalui analisis perangkat lunak ImageLab 5.2.1 (BioRad). Data berat molekul pada masing-masing pita ditampilkan dari setiap kelompok ditampilkan pada gambar 5.3 dan 5.4.



Gambar 5.4 Analisis berat molekul protein dari hasil SDS-PAGE.

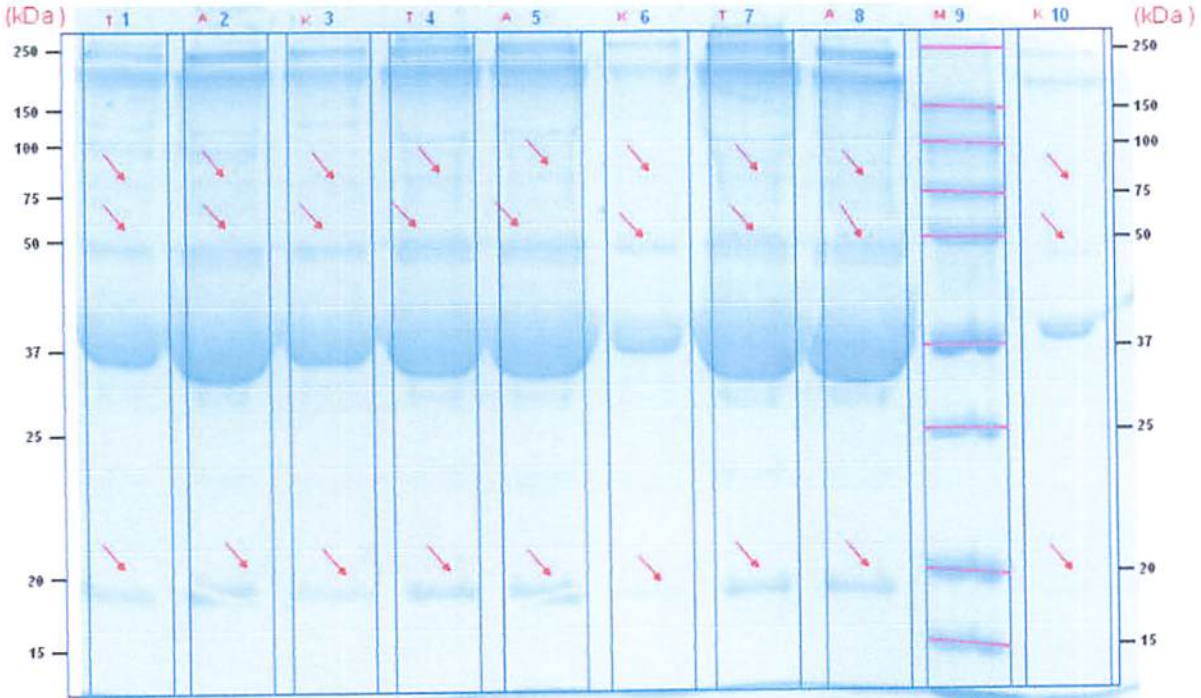
Tabel 5.3. Rerata Berat Molekul Protein

Rentang Berat Molekul (kDa)	Subjek					
	Orang Tua		Anak		Kontrol	
	Rerata (kDa)	SD	Rerata (kDa)	SD	Rerata (kDa)	SD
BM 250-150	193,35	24,84	190,40	20,86	193,76	18,738
BM 150-100	118,81	9,51	122,20	8,46	117,03	10,59
BM 100-75	88,90	6,84	87,05	5,43	85,20	8,36
BM 75-50	63,36	7,48	63,70	6,03	59,55	8,62
BM 50-37	44,66	2,40	44,92	3,48	44,45	5,86
BM 37-25	31,69	1,96	32,02	2,32	31,23	2,90
BM 25-20	22,81	0,83	22,97	1,07	22,72	1,61
BM 20-15	18,82	4,15	17,90	1,28	17,96	1,18
BM <15	13,23	1,00	13,49	1,17	13,16	1,33

Dari hasil analisis berat molekul pada setiap sampel, didapatkan rerata berat molekul yang terekspresi pada masing-masing kelompok (Tabel 5.3) adalah: 193,35 kDa; 118,81 kDa; 88,90 kDa; 63,36 kDa; 44,66 kDa; 31,69 kDa; 22,81 kDa; 18,82 kDa; 13,23 kDa (Kelompok orang tua); 190,40 kDa; 122,20 kDa; 87,05 kDa; 63,70 kDa; 44,92 kDa; 32,02 kDa; 22,97 kDa; 17,90 kDa; 13,49 kDa (Kelompok anak); 193,76 kDa; 117,03 kDa; 85,20 kDa; 59,55 kDa; 44,45 kDa; 31,23 kDa; 22,72 kDa; 17,96 kDa; 13,16 kDa (Kelompok kontrol). Tidak terdapat perbedaan berat molekul protein yang signifikan antar masing-masing kelompok ($p = 0,99$).

5.1.4 Uji Intensitas Pita Protein

Hasil karakterisasi profil protein dari seluruh subjek yang terdiri dari penderita *cleft lip and palate* (CLP), orang tua, dan kontrol menggunakan metode SDS-PAGE adalah sebagai berikut:

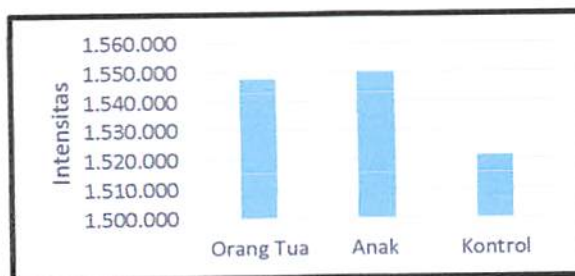


Gambar 5.5. Profil protein Menggunakan gel 12% SDS-PAGE pada Setiap Kelompok.

Tabel 5.4. Keterangan untuk gambar 5.5

Lane ke-...	Keterangan	Lane ke-...	Keterangan
1	Orang tua	6	Kontrol
2	Anak	7	Orang tua
3	Kontrol	8	Anak
4	Orang tua	9	Marker
5	Anak	10	Kontrol

Dari hasil pemeriksaan SDS-PAGE didapatkan protein dengan berat molekul 45-65 kDa didapatkan intensitas pita yang lebih tebal pada kelompok penderita dan orang tua, dibandingkan pada kelompok kontrol.



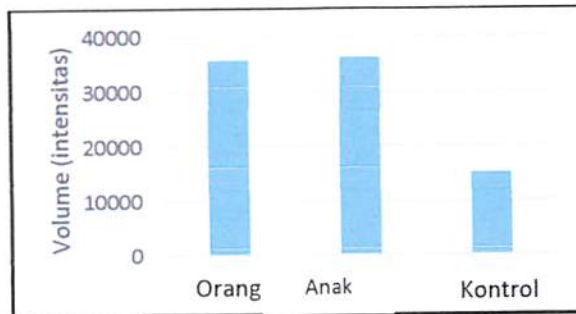
Gambar 5.6. Profil pita protein dengan kisaran berat molekul 45-65 kDa yang diduga sebagai target protein IRF6.

Tabel 5.5. Rerata Intensitas protein dengan kisaran berat molekul 45-65 kDa yang diduga sebagai target protein IRF6.

Orang Tua		Anak		Kontrol	
Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
1.547.751	368.636	1.549.865	368.461	1.516.657	349.010

Data gambar di atas menunjukkan rerata intensitas pita protein hasil dari SDS-PAGE pada masing-masing kelompok yang diukur menggunakan *perangkat lunak* ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad). Rerata dari masing-masing kelompok adalah: 1.547.751 (kelompok orang tua); 1.549.865 (kelompok anak); 1.516.657 (kelompok kontrol). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok ($p = 0,92$).

Hasil dari uji intensitas pada protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa yang diduga sebagai target protein PVRL1 menunjukkan ketebalan pita yang lebih tebal pada kelompok orang tua dan kelompok anak daripada kelompok kontrol. Rerata intensitas dari pita protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa disajikan pada gambar 5.9.

**Gambar 5.7.** Profil pita protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa yang diduga sebagai PVRL1**Tabel 5.6.** Rerata Intensitas protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa yang diduga sebagai target protein PVRL1.

Orang Tua		Anak		Kontrol	
Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
40913,04348	44113,4004	36238,71	32431,98	15232,26	17536,79

Dari hasil uji intensitas protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa didapatkan rerata pada masing-masing kelompok adalah: 40913,04 (kelompok orang tua), 36238,71(kelompok anak), dan 15232,26 (kelompok kontrol). Terdapat perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok ($p = 0,00$). Uji intensitas juga dilakukan pada pita protein dengan rentang berat molekul $\pm 15-20$ kDa. Rerata intensitas dari pita protein dengan kisaran berat molekul 15-20 kDa disajikan pada gambar 5.10. Dari hasil pemeriksaan SDS-PAGE didapatkan protein dengan berat molekul 15-20 kDa didapatkan intensitas pita yang lebih tebal pada kelompok penderita dan orang tua, dibandingkan pada kelompok kontrol.



Gambar 5.8. Profil pita protein dengan kisaran berat molekul 15-20 kDa.

Tabel 5.7. Rerata Intensitas protein dengan kisaran berat molekul 15-20 kDa.

Orang Tua		Anak		Kontrol	
Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
21950,54	22319,16	20792,5	16688,07	9541,39	8550,85

Dari hasil uji intensitas protein dengan kisaran berat molekul 15-20 kDa didapatkan rerata pada masing-masing kelompok adalah: 21950,54 (kelompok orang tua), 20792,5 (kelompok anak), dan 9541,39 (kelompok kontrol). Terdapat perbedaan yang signifikan antara masing-masing kelompok ($p = 0,03$).

5.2 Luaran yang Dicapai

Telah dilakukan proses *submit* terhadap hasil penelitian ini ke jurnal internasional terindeks Scopus, yaitu: *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*.

BAB 6**RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA**

Tahap selanjutnya yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah melakukan uji *western blot* terhadap protein PVRL-1 dan IRF6, serta melakukan analisis proteomik dengan menggunakan MALDI-TOF/TOF-MS untuk mengidentifikasi protein target lainnya.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Terdapat perbedaan profil protein dan berat molekul protein yang terekspresi melalui uji SDS-PAGE antara penderita CLP daripada kelompok kontrol.
2. Didapatkan rata-rata intensitas protein yang lebih tinggi pada protein dengan kisaran berat molekul 70-100 kDa yang diduga sebagai target protein PVRL1 pada penderita *cleft lip and palate* dibandingkan kelompok kontrol.
3. Didapatkan rata-rata intensitas protein yang lebih tinggi pada protein dengan kisaran berat molekul 45-65 kDa yang diduga sebagai target protein IRF6 pada penderita *cleft lip and palate* dibandingkan kelompok kontrol.
4. Terdapat perbedaan nilai migrasi relatif protein (Rf) yang signifikan antara penderita CLP dengan orang normal.

7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih dengan pendekatan proteomik yang lebih lanjut untuk mengidentifikasi protein yang terekspresi berbeda pada kelompok

penderita CLP dibandingkan kelompok kontrol, serta menunjang hasil SDS-PAGE sehingga didapatkan *profiling* protein penderita CLP.

2. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkap dan membuktikan ekspresi dan peran protein dengan berat molekul 222, 76 kDa terhadap kejadian CLP.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan pendekatan genomik untuk menunjang analisis protein yang sudah didapat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbenorku P. 2013. Orofacial Clefts: A Worldwide Review of The Problem. *ISRN Plastic Surgery* 2013:1-7
- Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R. 2010. Generating and Navigating Proteome Maps Using Mass Spectrometry. *Nature Reviews Molecular Biology*. 11: 789-801.
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch SD, Romitti PA, Murray JC. 2006. PVRL1 Variants Contribute to Non-Syndromic Cleft Lip and Palate in Multiple Populations. *Am J Med Genet A*. 140(23): 2562-70.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, de Marqui ABT, Tajara EH. 2012. Proteomics: Methodologies and Applications to The Study of Human Diseases. *Rev Assoc Med Bras*. 58(3): 366-75.
- Biggs LC, Nardze R, Demali KA, Lusche DF, Kuhl S, Soll DR. 2014. Interferon Regulatory Factor 6 Regulates Keratinocyte Migration. *J Cell Sci* 127(13): 2840-8.
- Bush JO, Jiang R. 2012. Palatogenesis: Morphogenetic and Molecular Mechanisms of Secondary Palate Development. *Development*. 828 (139): 231-43.
- Cooper ME, Ratay JS, Marazita ML. 2006. Asian Oral-Facial Cleft Birth Prevalence. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 43(5): 580-9.
- Cuddapah SR, Kominek S, Grant III JH, Robin NH. 2016. IRF6 Sequencing in Interrupted Clefting *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 53(3): 373-6.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. 2011. Cleft Lip and Palate: Synthesizing Genetic and Environmental Influences. *Nat Rev Genet* 12(3): 167-78.
- Fatchiyah, Arumningtyas EL, Widyarti S, Rahayu S. 2011. Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis. Jakarta: Erlangga: 118-22.
- Garcia-Féria LM, Ureña-Aranda CA, de Los Monteros AE. 2015. Minimally Invasive Blood Sampling Method for Genetic Studies on *Gopherus* Tortoises. *Animal Biodiversity and Conservation* 38(1): 31-5.
- Giaquinto-Cilliers MGC, Potgieter MD, Links DA, Van Schalkwyk GI. 2013. Cleft Lip and Palate Malformations: Essential Knowledge for The General Practitioner. *South African Family Practice* 55(6): 533-7. 53(3): 373-6.
- Gurramkonda VB, Syed AH, Murthy J, Lakkakula BVKS. 2017. IRF6 rs2235365 Single Nucleotide Polimorphism is Associated With Isolated Non-syndromic Cleft Palate But Not With Cleft Lip With or Without Palate in South Indian Population. *Braz. J. Otorhinolaryngol*. 545: 1-5.
- Herkrath AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. 2012. Parental Age As A Risk Factor for Non-Syndromic Oral Clefts: A Metaanalysis. *J Dent*. Jan.40(1):3-14.
- Higashihori N, Buchtová M, Richman JM. 2010. The Function and Regulation of TBX22 in Avian Frontonasal Morphogenesis. *Developmental Dynamics*. 239: 458-73.
- Huynh J, Scholz GM, Aw J, Kwa MQ, Achuthan A, Hamilton JA, Reynolds EC. 2015. IRF6 Regulates the Expression of IL-36 γ by Human Oral Epithelial Cells in Response to *Porphyromonas gingivalis*. *The Journal of Immunology*. 196: 2230-8.
- Ifzah, Shakeel M, Patel Z. 2016. Genetics In Cleft And Palate—A Review. *Ejpmr* 3(8): 200-6.

- Inoyatov A, Abdurakhmanov M, Sharopov S, Azimov M. 2012. The Condition of Immune System of Infants With Congenital Cleft Lip and Palate. *Medical and Health Science Journal* 10: 23-9.
- Istiyana DT, Hartoyo E, Sukmana BI. 2016. Hubungan Antara Penderita Pre-Gestasional Diabetes Mellitus Dengan Resiko Kelahiran Bayi *Cleft Lip and Palate*. *DENTINO Jurnal Kedokteran Gigi*. 1(1): 32-6.
- Jagomagi T, Soots M, Saag M. 2010. Epidemiologic Factors Causing Cleft Lip and Palate and Their Regularities of Occurrence in Estonia. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*. 12: 105-8.
- Jiang RS, Zhao X, Liu R. 2012. Non-syndromic Cleft Palate: Analysis of TBX22 Exon 5 Gene Mutation. *Arch Med Sci*. 8(3): 406-10.
- Joly S, Rhea L, Volk P, Moreland JG, Dunnwald M. 2016. Interferon Regulatory Factor 6 Has A Protective Role in The Host Response to Endotoxic Shock. *PLoS ONE* 11(4): e0152385: 1-12.
- Kaewkhampa A, Jotikasthira D, Mlaivijitnond S, Kantaputra P. 2012. TBX22 Mutation Associated With Cleft Lip/Palate, Hypodontia, and Limb Anomaly. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 49(2): 240-4.
- Kembaren L. 2012. Penderita Bibir Sumbing Tambah 7500 per Tahun. *Jurnal Nasional*. Kuta: Nov 2012: 11.
- Kerameddin S, Namipashaki A, Ebrahimi S, Ansari-Pour N. 2015. IRF6 is A Marker of Severity in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *JDR Clinical Research Supplement* 94(9): 2265-325.
- Kim J, Chang A, Dudak A, Federoff HJ, Lim ST. 2011. Characterisation of Nectin Processing Mediated By Presenilin-Dependent Gamma-Secretase. *J Neurochem*. 119(5): 945-56.
- Kim J, Lilliehook C, Dudak A, Prox J, Saftig P, Federoff HJ, Lim ST. 2010. Activity-dependent α -Cleavage of Nectin-1 is Mediated by A Disintegrin and Metalloprotease 10(ADAM10). *The Journal of Biological Chemistry*. 285(30): 22919-22926.
- Kohli SS, Kohli VS. 2012. A Comprehensive Review of The Genetic Basis of Cleft Lip and Palate. *J Oral Maxillofac Pathol*. 16(1): 64-72.
- Ladeira PRSD, Alonso N. 2012. Protocols in Cleft Lip and Palate Treatment: Systematic Review. *Plastic Surgery International*. 562892: 1-9.
- Leslie EJ, Liu H, Carlson JC, Shaffer JR. 2016. A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3. *The American Journal of Human Genetics* 98: 1-11.
- Li P, Wong JJ, Sum C, Sin WX, Ng KQ, Koh MB. 2011. IRF8 and IRF3 Cooperatively Regulate Rapid Interferon-beta Induction in Human Blood Monocytes. *Blood*. 117(10): 2847-54.
- Liu Y, Beyer A, Aebbersold R. 2016. On The Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 165: 535-50.
- Loho JN. 2013. Prevalensi Labioschisis di RSUP. Prof. Dr. R. D. Kandou Manado Periode Januari 2011-Oktober 2012. *Jurnal e-Biomedik (eBM)* 1(1): 396-401.
- Lopes VLG, Monlleo IL. 2014. Risk Factor and Prevention of Oral Cleft. *Braz Oral Res*. 28(1):1-5.

- Mahmood T, Yang P-C. 2012. Western Blot : Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 4(9): 429-34.
- Marcano ACB, Doudney K, Braybrook C. 2004. TBX22 Mutations Are A frequent Cause of Cleft Palate. *Journal of Medical Genetics.* 41: 68-74.
- Martelli DRB, Coletta RD, Oliveira EA, Swerts MSO, Rodrigues LAM, Oliveira MC, Junior HM. 2015. Association Between Maternal Smoking, Gender, And Cleft Lip and Palate. *Braz. J otorhinolaryngol.* 81(5): 514-20.
- Neves ATS, Vieira AMM, Aranha AMF, Borba AM, Borges AH, Volpato LER. 2015. Cleft Lip and Palate: Associated Genetic and Environmental Factors. *Scientific Journal of Dentistry.* 2: 19-25.
- Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, Jabs EW, Kolk CAV, Wu-Chou YH, Chen PK. 2007. Association Between IRF6 and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Four Populations. *Genetics in Medicine* 9(4):219-27.
- Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, Larsson C, Karsten A. 2008. Familial Non-syndromic Cleft Lip and Palate – Analysis of The IRF6 Gene and Clinical Phenotypes. *European Journal of Orthodontics* 30: 169-75.
- Radojicic J, Tanic T, Radojicic A. 2006. Smoking in Pregnancy-The Risk Factor For The Development of Lip and Palate Clefts with Fetus. *Medicine and Biology.* 13(1): 44-8.
- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. 2012. Genetics of Nonsyndromic Orofacial Clefts. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 49(1): 73-91.
- Ramnath D. 2014. Role of IRF6 in Epithelial Cell-Mediated Host Defence and Inflammation [Tesis]. The University of Queensland. Queensland.
- Rantam FA. 2003. Metode Immunologi. Surabaya: Airlangga University Press: 145-53.
- Reswan A. 2006. Perancangan Sistem Pakar Untuk Menentukan Diagnosis dan Rencana Terapi Bagi Penyandang Cacat Celah Bibir dan Langit-Langit Berdasarkan Protokol Operasi Bedah Plastik. *Prosiding Seminar Nasional Manajemen Teknologi III.*
- Roy S, Kumar V. 2014. Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research (IJSR).* 3(8): 955-60.
- Roy VK, Kumar NS, Gurusubramanian G. 2012. Proteins – Structure, Properties and Their Separation by SDS – Polyacrilamide Gel Electrophoresis. *Sci Vis.* 12(4): 170-81.
- Sahibzada HA, Khurshid Z, Khan RS, Naseem M, Siddique KM, Mali M, Zafar MS. 2017. Salivary IL-8, IL-16, and TNF- α as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. *Diagnostics* 7(21): 1-10.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Carinci F. 2006. Study of The PVLRL1 Gene in Italian Non-syndromic Cleft Lip Patients With or Without Cleft Palate. *Annals of Human Genetics.* 70(3): 410-3.
- Shah SN, Khalid M, Khan MS. 2011. A Review of Classification Systems For Cleft Lip and Palate Patients – Morphological Classifications. *JKCD.* 1(2): 95-9.
- Shi Y, Mowery RA, Ashley J, Hentz M, Ramirez AJ, Bilgicer B, Slunt-Brown H, Borchelt DR, Shaw BF. 2012. Abnormal SDS-PAGE Migration of Cytosolic Proteins can Identify Domains and Mechanisms That Control Surfactant Binding. *Protein Science.* 21: 1197-1209.

- Shirai A, Matsuyama A, Yashiroda Y, Hashimoto A, Kawamura Y, Arai R, Komatsu Y, Horinuchi S, Yoshida M. 2008. Global Analysis of Gel Mobility of Proteins and Its Use in Target Identification. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(16): 10745-52.
- Shkoukani MA, Chen M, Vong A. 2013. Cleft Lip- A Comprehensive Review. *Pediatric Otolaryngology*. 1(5): 1-10
- Shu SY, Zhang MJ, Tang SJ, Chen WL, Wu SR, Lin Y, Chen QS. 2015. Mutation Analysis of PVLR1 in Patients With Non-syndromic Cleft Of The Lip and/or Palate in Guangdong. *Genet. Mol. Res.*. 14(2): 3400-08.
- Sianita PP, Alawiyah T. 2011. Kelainan Celah Bibir Serta Langit-Langit dan Permasalahannya Dalam Kaitan Dengan Interaksi Sosial dan Perilaku. *JITEKGI*. 8(2): 42-6.
- Silva TL, Cox AA, Boominathan VP, Jezewski PA, Ferreira TL. 2012. Early Expression of the *tbx22* Gene in Zebrafish Influences Positioning of Pharyngeal Arch Cartilages. *American Journal of Molecular Biology*. 2: 318-31.
- Singh D, Bastian TS, Kudva, Singh MK, Sharma P. 2015. Classification Systems for Orofacial Clefts. *Oral Maxillofac Pathol J*. 6(1): 556-60.
- Sozen MA, Tolarova MM, Spritz RA. 2008. Study of The CLPTM1 in South American Non-Syndromic Cleft Lip Patients With or Without Palate. *Eur J Gen Med*. 5(3): 134-9.
- Sun K, Oh H, Emerson JF, Raghavan SR. 2012. A New Method For Centrifugal Separation of Blood Components: Creating A Rigid Barrier Between Density-Stratified Layers Using a UV-curable Thixotropic Gel. *J. Mater. Chem.* (22): 2378-82.
- Supit L, Prasetyono TO. 2008. Cleft Lip and Palate Review: Epidemiology, Risk Factors, Quality of Life, and Importance of Classifications. *Narrative Review on Cleft Lip and Palate* 17(4): 226-39.
- Tobing JN. 2017. Identifikasi Faktor Resiko Eksogen Maternal Orofacial Cleft Non-sindromik. *CDK* 257(10): 690-4.
- Vaillant AAJ, McFarlane-Anderson N, Akpaka PE, Smikle MP, Ramirez N, Cadiz A. 2013. Use of Dot Blots Analysis in The Separation of Anti-HIV Antibodies in Animals. *J Chroat Separation Techniq*. 4(5): 1-3.
- Wang A, Wang CP, Tu M, Wong DTW. 2016. Oral Biofluid Biomarker Research: Current Status and Emerging Frontiers. *Diagnostics* 6(45): 1-15.
- Wu-Chou YH, Lo LJ, Chen KTP, Chang CSF, Chen YR. 2013. A Combined Targeted Mutation Analysis of IRF6 Gene Would be Useful in the First Screening of Oral Facial Clefts. *BMC Medical Genetics* 14(37): 1-5.
- Zhou Q, Li M, Zhu W, Gou J, Wang Y, Li Y, Li S. 2013. Association Between Interferon Regulatory Factor 6 Gene Polimorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Chinese Population. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 50(5): 570-6.

LAMPIRAN

Lampiran 1: Sertifikat Laik Etik



**UNIVERSITAS AIRLANGGA FACULTY OF DENTAL MEDICINE
HEALTH RESEARCH ETHICAL CLEARANCE COMMISSION**

ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE
Number : 305/HRECC.FODM/XII/2017

Universitas Airlangga Faculty Of Dental Medicine Health Research Ethical Clearance Commission has studied the proposed research design carefully, and therefore, shall herewith certify that the research entitled :

**“POLA EKSPRESI TBX22, PVRL-1, DAN IRF6 PADA PENDERITA
CLEFT LIP AND PALATE”**

Principal Researcher : REGINA PURNAMA DEWI ISKANDAR

Unit/Institution/Place of Research : - Yayasan *Clift Lip and Palate Center*
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas
Airlangga Surabaya

CERTIFIED TO BE ETHICALLY CLEARED

 Surabaya, December 29th, 2017
Chairman,



Prof. M. Rubianto, Dr., drg., MS., Sp.Perio(K)
Official No.195009081978021001

Lampiran 2: Draft Artikel Ilmiah

THE DENSITOMETRICS ANALYSIS OF PROTEIN PATTERN IN CLEFT LIP AND PALATE PATIENTS

Regina P.D. Iskandar¹, Annisa Proboningrat², Amaq Fadholly³,
Ida B. Narmada³, Chairul A. Nidom⁴, Sri A. Sudjarwo⁴

¹ Doctoral student, Faculty of Medicine, Airlangga University; ² Doctoral Student, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University; ³ Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Airlangga University; ⁴ Department of Veterinary Basic Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University.

*Corresponding Author: Sri Agus Sudjarwo, ags158@yahoo.com

ABSTRACT

Background: Cleft Lip and Palate (CLP) belongs to congenital anomaly that is clinically seen as cleft in lip, alveolar bone, palate, and nasal septum. The patients suffer from esthetic and various functional defect. CLP is resulted from impaired palatogenesis during embryonic phase. The etiology of CLP is influenced by genetic, environmental, and combination of both. According to the literatures, CLP is highly associated with defect in IRF6 and PVRL1 genes. **Objectives:** To profile total protein in plasma of CLP patients and identify protein IRF6 and PVRL1. **Method:** Dot-Blot analysis was performed to identify protein target of IRF6 and PVRL1. SDS-PAGE was performed in gel concentration 12% using plasma of CLP patients, their parents, and control population. The gels were stained by Coomassie Blue afterwards. Gels were analysed through ImageLab 5.2.1 software. **Results:** The intensity of major bands in CLP patients were darker than control group, but remain similar to parents group. The target protein IRF6 and PVRL1 were positively identified through Dot-Blot. Rf (retardation value) were significantly different in major bands of CLP patients compared to control group. **Conclusion:** There pattern of protein profile in CLP patients were different compared to non-CLP.

Keywords: Cleft lip and palate, IRF6, PVRL1, SDS-PAGE

INTRODUCTION

Orofacial cleft is considered as congenital anomaly with multifactorial etiology. The term orofacial cleft refers to cleft in either lip, palate, or both cleft lip and palate. The etiology of the cleft is multifactorial, influenced by genetic and environmental factors (Souza and Raskin, 2013). CLP occurs more frequently in Asian and Native American populations compared to Caucasians and Africans, with the incidence ranges from 1/500 to 1/2000 live births (Khazaei et al., 2011). The prevalence of CLP in Indonesia is 0,2% (Tobing, 2017). It was reported in 2012 by The International Organisation of Cleft Lip Training Centre that there

Lampiran 3: Status *submission*