



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131  
Telp. (031) 5020251, 5030252-3 Fax. (031) 5022472  
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id> e-mail : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

**SALINAN**

**PERATURAN  
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOMOR 207/UN3.1.1/HK/2022**

**TENTANG**

**PENYANGGAH UJIAN DOKTOR TERBUKA PROGRAM DOKTOR  
PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
ATAS NAMA SRI ASTUTIK ANDAYANI, S.Kep.,Ns.,M.Kes.**

**DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA  
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN**

- Menimbang :
- a. bahwa ujian disertasi tahap I Jenjang Doktor telah dilaksanakan, selanjutnya mahasiswa yang dinyatakan lulus dari ujian tahap I tersebut berhak mengikuti ujian tahap II yang disebut Ujian Doktor Terbuka;
  - b. bahwa nama-nama Penyanggah Ujian Doktor Terbuka yang tercantum dalam lampiran Keputusan ini dinyatakan memenuhi syarat dan bersedia untuk ditetapkan sebagai penyanggah Ujian Doktor Terbuka;
  - c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga tentang Penyanggah Ujian Doktor Terbuka Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran.
- Mengingat :
1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4301);
  2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 14 Tahun 2005 tentang Guru dan Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 157, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4586);
  3. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5336);

4. Undang-Undang Nomor 5 Tahun 2014 tentang Aparatur Sipil Negara (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 06, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5494);
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga Di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1954 Nomor 99 Tambahan Lembaran Negara Nomor 695 juncto Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1955 Nomor 4 Tambahan Lembaran Negara Nomor 748);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
7. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5535);
8. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 38 Tahun 2017 tentang Peraturan Pendidikan Universitas Airlangga;
9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 21 Tahun 2014 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor (S3) Universitas Airlangga;
10. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1947/H3/KR/2011 tentang Penetapan Ruang Lingkup Program Studi dalam Kategori Monodisiplin, Interdisiplin dan Multidisiplin untuk Pengelolaan Program Magister dan Program Doktor;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 762/UN3/KR/2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas, Direktur Sekolah Pascasarjana, dan Direktur Rumah Sakit Periode 2020-2025.

MENETAPKAN :

PENYANGGAH UJIAN DOKTOR TERBUKA PROGRAM DOKTOR  
PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
ATAS NAMA SRI ASTUTIK ANDAYANI, S.Kep.,Ns.,M.Kes.

## BAB I

Menetapkan Penyanggah Ujian Doktor Terbuka Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran atas nama Sri Astutik Andayani, S.Kep.,Ns.,M.Kes. yang dilaksanakan pada tanggal, 28 April 2022 dengan susunan nama sebagai berikut:

1. Dr. Margarita M. Maramis, dr.,Sp.KJ(K)
2. Dr. Sulistiawati, dr.,M.Kes.
3. Prof. Dr. Ir. Qomariyatus Sholihah, Amd.Hyp., ST.,M.Kes.,IPU.ASEAN.Eng
4. Dr. Joni Wahyuhadi, dr.,Sp.BS(K)
5. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr.,Sp.KK(K),FINSADV.,FAADV
6. Dr. Hanik Badriyah Hidayati, dr.,Sp.S(K)
7. Dr. Eighty Mardiyah Kurniawati, dr.,Sp.OG(K)
8. Prof. Dr. Ah. Yusuf S., S.Kp.,M.Kes.
9. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K)

## BAB II

Dalam menjalankan tugasnya sebagaimana dimaksud dalam diktum PERTAMA, berpedoman pada peraturan dan ketentuan yang berlaku serta mempertanggungjawabkan tugasnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran.

## BAB III

Biaya untuk keperluan tersebut dibebankan pada dana Rencana Kegiatan dan Anggaran Tahunan (RKAT) Fakultas Kedokteran.

## BAB IV

Peraturan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya  
pada tanggal 28 April 2022

DEKAN,

ttd

Budi Santoso  
NIP. 196302171989111001

Salinan sesuai dengan aslinya  
Kepala Bagian Tata Usaha,



SALINAN disampaikan Yth.  
1. Rektor Universitas Airlangga  
2. Yang bersangkutan

**DISERTASI**

**MODEL PERSEPSI DAN PERILAKU SEKSUAL BERISIKO PADA REMAJA  
PUTRI DI PONDOK PESANTREN PROBOLINGGO**



**SRI ASTUTIK ANDAYANI**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

MODEL PERSEPSI DAN PERILAKU SEKSUAL BERISIKO PADA REMAJA  
PUTRI DI PONDOK PESANTREN PROBOLINGGO

TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 20 Mei 2022

Oleh

Promotor



Dr. Margarita Maria Maramis dr., Sp.KJ (K), FISCM

NIP. 195511291984032001

Ko-Promotor



Dr. Sulistiawati, dr., M.Kes

NIP. 196502281990032002

## ABSTRAK

### MODEL PERSEPSI DAN PERILAKU SEKSUAL BERISIKO PADA REMAJA DI PONDOK PESANTREN PROBOLINGGO

Sri Astutik Andayani

**Latar belakang:** Perilaku seksual berisiko sangat berbahaya bagi kesehatan reproduksi, termasuk penularan Infeksi Menular Seksual (IMS), kehamilan diluar nikah, yang akibatnya meningkatkan angka aborsi, tekanan psikologis, dan depresi. **Obyektif:** penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi faktor biopsikososial dan spiritual yang mempengaruhi perilaku seksual berisiko remaja di Probolinggo. **Metode:** Desain tahap satu adalah penelitian kuantitatif korelasional dengan desain *cross sectional*. Populasi sejumlah 384 remaja usia 16-19 tahun yang dipilih secara cluster random sampling. Pengumpulan data menggunakan kuisisioner tentang faktor-faktor biopsikososial yang memengaruhi perilaku seksual berisiko remaja. Data dianalisis dengan uji *Structural Equation Modelling-Partial Least Square* (SEM-PLS). Desain tahap dua menggunakan *quasi eksperimen*. **Hasil:** Faktor yang berhasil ditemukan adalah faktor biologis dengan indikator masa pubertas dengan nilai T 4,387, faktor psikologis dengan indikator *self esteem* dan *self efficacy*, keserdasan emosional dengan nilai T 4,597, faktor sosial meliputi; peran orang tua, peran teman sebaya, peran sekolah, peran guru, system pendidikan pesantren dan peran media sosial dengan nilai T 4,369 dan faktor spiritual meliputi kecerdasan spiritual dan religiusitas dengan nilai T 9.060, faktor persepsi seksual dengan dimensi kognitif dan afektif dengan nilai T 7,028. Hasil tahap kedua menunjukkan terdapat perbedaan signifikan persepsi dari aspek kognitif dan afektif sebelum dan sesudah intervensi. **Kesimpulan:** faktor spiritual dan persepsi seksual terbukti sebagai faktor protektif yang paling bermakna dalam mempengaruhi perilaku seksual berisiko remaja santri putri.

**Kata Kunci :** Remaja, Perilaku seksual berisiko, Persepsi, Biopsikososial spiritual





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131  
Telepon 031-5020251, 031-5030253, Fax 031-5022472  
Website : <http://www.fk.unair.ac.id>, Email : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

**SALINAN**

**KEPUTUSAN  
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
NOMOR 41/UN3.1.1/HK.04/2020**

**TENTANG**

**PANITIA UJIAN TAHAP PERTAMA (TERTUTUP)  
PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN ATAS NAMA ABDULLOH MACHIN, dr., Sp.S(K).**

**DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN,**

- Menimbang :
- a. bahwa sehubungan dengan telah siap dilakukan ujian tahap pertama (tertutup) Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran, maka perlu dibentuk panitia ujian tahap pertama (tertutup) tersebut;
  - b. bahwa nama-nama yang tersebut di bawah ini telah memenuhi syarat dan bersedia untuk diangkat sebagai panitia ujian dimaksud;
  - c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran tentang panitia ujian tahap pertama (tertutup) Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran.
- Mengingat :
1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4301);
  2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 14 Tahun 2005 tentang Guru dan Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 157, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4586);
  3. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5336);
  4. Undang-Undang Nomor 5 Tahun 2014 tentang Aparatur Sipil Negara (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 06, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5494);

5. ...



5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga Di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1954 Nomor 99 Tambahan Lembaran Negara Nomor 695 juncto Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1955 Nomor 4 Tambahan Lembaran Negara Nomor 748);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
7. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5535);
8. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 27 Tahun 2018 tentang Peraturan Pendidikan Universitas Airlangga;
9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 21 Tahun 2014 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor (S3) Universitas Airlangga;
10. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1947/H3/KR/2011 tentang Penetapan Ruang Lingkup Program Studi dalam Kategori Monodisiplin, Interdisiplin dan Multidisiplin untuk Pengelolaan Program Magister dan Program Doktor;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1732/UN3/2015 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana Periode 2015-2020.

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN TENTANG PANITIA UJIAN TAHAP PERTAMA (TERTUTUP) PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN ATAS NAMA ABDULLOH MACHIN, dr., Sp.S(K).

PERTAMA. ...

**PERTAMA** : Membentuk panitia ujian tahap pertama (tertutup) Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran atas nama Abdulloh Machin, dr., Sp.S(K) yang dilaksanakan pada tanggal, 24 Januari 2020 dengan susunan nama-nama sebagai berikut:

Ketua : Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt  
Anggota : 1. Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI., FINASIM  
2. Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K)  
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES  
4. Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes  
5. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr., Sp.KK  
6. Dr. H. Imam Susilo, dr., Sp.PA(K)., FISCAM

**KEDUA** : Dalam menjalankan tugasnya sebagaimana dimaksud dalam diktum PERTAMA, berpedoman pada peraturan dan ketentuan yang berlaku serta mempertanggungjawabkan tugasnya kepada Dekan Fakultas Kedokteran.

**KETIGA** : Biaya untuk keperluan tersebut dibebankan pada dana Rencana Kegiatan dan Anggaran Tahunan (RKAT) Fakultas Kedokteran.

**KEEMPAT** : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya  
pada tanggal 26 Januari 2020

DEKAN,

ttd

**SOETOJO**

NIP 195606081986121001

Salinan sesuai dengan aslinya  
Kepala Bagian Tata Usaha,

Basuni

NIP 196501021987011001

SALINAN disampaikan Yth.

1. Rektor Universitas Airlangga
2. KPS S3 Ilmu Kedokteran
3. Yang bersangkutan

# DISERTASI

**PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON  
MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF  
EGCG PADA *Rattus norvegicus*  
MODEL STROKE ISKEMIK AKUT**



**ABDULLOH MACHIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

# **DISERTASI**

## **PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF EGCG PADA *Rattus norvegicus* MODEL STROKE ISKEMIK AKUT**

**ABDULLOH MACHIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

**PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON  
MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF  
EGCG PADA *Rattus norvegicus*  
MODEL STROKE ISKEMIK AKUT**

Untuk Memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan  
Dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Akhir  
Tahap 2 (Terbuka)

Hari : Kamis  
Tanggal : 2 Maret 2020  
Pukul : 10..00 WIB

Oleh:  
**ABDULLOH MACHIN**  
**011317017329**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DISERTASI**

**PENGHAMBATAN PROSES KEMATIAN SEL NEURON  
MENGUNAKAN *Camillia sinensis* DENGAN BAHAN AKTIF  
EGCG PADA *Rattus norvegicus* MODEL STROKE ISKEMIK  
AKUT**

**TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 13 APRIL 2020**

Oleh:  
Promotor



**Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI., FINASIM  
NIP 19561103 198403 1 001**

Kopromotor



**Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K),  
NIP 19640129 199003 1 004**

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai  
oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)  
pada tanggal 24 januari 2020**

**Panitia Penguji :**

- Ketua : 1. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, Msi.,  
Anggota : 2. Prof. Dr. Nasronuddin, dr, Sp.PD, KPTI, FINASIM,.  
3. Dr. Paulus Sugianto, dr, Sp.S(K),.  
4. Prof. Dr. Aulianiam, DVM., DES  
5. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr, SpKK(K),.  
6. Dr. Budi Utomo, dr, Mkes,.  
7. Dr. Imam Susilo, dr, Sp.PA(K),.  
8. Dr. Imam Subadi, dr, Sp.KFR(K),.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Tentang Panitia Penguji Disertasi  
Nomor: 41/UN3.1.1/HK.04/2020  
Tanggal: 26 Januari 2020

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah kami ucapkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmad, hidayah dan inayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi “Mekanisme Neuroproteksi *Camelia Sinensis* Dengan Bahan Aktif EGCG Dalam Menghambat Proses Kematian Sel Neuron Pada Model *Rattus Norvegicus* Yang Dilakukan *Middle Cerebral Artery Oclussion* (MCAO)”. Disertasi ini kami harapkan dapat menjadi sebuah dasar bagi pengembangan dan pendekatan terapi *adjuvant* stroke iskemik akut.

Teh hijau adalah minuman yang relatif murah dan mudah untuk dikonsumsi sehari-hari. Teh sendiri adalah minuman yang paling populer di dunia. Pada survey yang dilakukan di Jepang didapatkan bahwa orang yang mengkonsumsi teh hijau lebih kecil kemungkinan terkena stroke iskemik akut dan apabila terkena serangan stroke, maka memiliki disabilitas yang lebih baik. Pada penelitian ini, kami melakukan pendekatan teh hijau sebagai terapi tambahan stroke iskemik akut dengan melihat marker-marker kematian sel melalui proses apoptosis dan nekroptosis. Kami juga melihat marker yang diproduksi sebagai reaksi stres oksidatif yang terjadi oleh kondisi iskemia.

Penelitian ini dapat terlaksana tentu bukan oleh kekuatan penulis, namun oleh karena pertolongan banyak pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung membantu penulis dari sejak mulai melaksanakan pendidikan, mendapatkan inspirasi tema penelitian, memberikan masukan konsep-konsep yang diperlukan dalam penelitian ini, membantu dalam membuat konsep metode yang akan dilaksanakan, saat melaksanakan penelitian, saat mengkompilasi hasil penelitian dan saat membuat laporan disertasi ini, sehingga dengan kerendahan hati kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan petunjuk dan kemudahan dalam melaksanakan penelitian ini.



2. Prof. Dr. H. Fasichul Lisan., Apt selaku rektor Universitas Airlangga periode 2010-2015
3. Prof. Dr. Moh. Nasich., SE, Ak., CMA., Selaku rektor Universitas Airlangga periode 2015 – sekarang
4. Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., Sp.PD., KEMD., FINASIM selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2010-2015
5. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K),. Selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-sekarang
6. Dodo Anondo, dr, MPH,. selaku direktur RSUD Dr. Soetomo periode 2011-2016
7. Harsono, dr,. selaku direktur RSUD Dr. Soetomo periode 2016-2018
8. Dr. Joni Wahyuhadi, dr, Sp.BS(K),. selaku direktur RSUD Dr. Soetomo periode 2018-sekarang
9. Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr, Sp.A(K),. Selaku KPS S-3 Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2010-2015
10. Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR., Selaku KPS S-3 Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-2020
11. Wijoto, dr., Sp.S(K),. Selaku ketua departemen Ilmu Penyakit saraf Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2010-2015
12. Dr. M. Hamdan, dr., Sp.S(K),. Selaku ketua departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-sekarang
13. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc., dr., Sp. Park(K),. selaku penasehat akademik kami yang dengan sabar telah memberikan ilmunya dan memberi petunjuk kami dalam membuat konsep-konsep dasar penelitian kami
14. Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI.FINASIM selaku promotor kami yang telah dengan sabar membimbing kami dalam melaksanakan penelitian kami

15. Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K)., selaku kopromotor kami yang telah dengan sabar membimbing kami dalam melaksanakan penelitian kami
16. Tim penguji kami baik saat ujian kualifikasi, ujian proposal, ujian kelayakan, ujian tertutup sampai dengan ujian terbuka yang telah memberikan masukan yang berharga untuk perbaikan penelitian kami Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI.FINASIM, Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K)., . Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, Msi., Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc., dr., Sp. Park(K)., Prof. Dr. Aulianiam, DVM., DES , Dr. Afif Nurul Hidayati, dr, SpKK(K)., , Dr. Budi Utomo, dr, Mkes., , Dr. Imam Susilo, dr, Sp.PA(K)., , Dr. Imam Subadi, dr, Sp.KFR(K)., , M. Miftahussurur, dr, M.Kes., Sp.PD., FINASIM,. Ph.D.,
17. Dosen-dosen program S-3 Ilmu Kedokteran Dasar Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang dengan sabar membimbing kami
18. Ibu kami tercinta Hj. Rosyidah yang mencurahkan cintanya kepada kami dan mendidik kami dengan sabar dan mengarahkan kami sehingga dapat menjadi dokter spesialis saraf
19. Saudara-saudara saya Tho'atin Nasichah, Maria Ulfa, Halimah Sa'diyah, Faruq Abdul Mu'id, Intan Khodijatul Kubra, M. Faiz Aminullah, dan Ayu Umi Salamah yang menyemangati kami untuk menyelesaikan disertasi ini.
20. Mertua kami HM. Ali Imron Rosyadi dan Hj. Nur Abidah yang dengan sabar memberikan semangat kepada kami untuk menyelesaikan Pendidikan ini
21. Istri saya Queen Khoirunnisa Mairo, SST., M.Keb., yang dengan sabar memberikan semangat kepada kami untuk menyelesaikan Pendidikan ini
22. Anak-anak kami Sayyidah Marwah As'adinnisa, Syarifah Shofa Akrominnisa, RM Muhammad Lukman Hakim Wicaksono yang memberikan semangat pada kami

23. Rekan-rekan S-3 Ilmu Kedokteran Dasar Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2013 yang kompak dan saling mensupport
24. Rekan-rekan Staff Departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang selalu menyemangati kami dalam menyelesaikan Pendidikan ini
25. Ayah kami tercinta Alm. HM. Chotib Achsan yang telah mendidik kami dengan sabar dan mengarahkan kami sehingga dapat menjadi dokter spesialis saraf
26. Prof. Junaidi Chotib., Apt., Ph.D., Dr. Imam Susilo, dr, Sp.PA(K),, Chrismawan., Apt., Ph.D., serta semua pihak yang mendukung kami dalam melaksanakan penelitian ini
27. Semua mahasiswa Pendidikan spesialis neurologi Fakultas kedokteran Universitas Airlangga yang telah banyak membantu kami baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga disertasi ini dapat kami selesaikan.

Surabaya, 01 Januari 2013

Penulis

## RINGKASAN

### **Penghambatan Proses Kematian Sel Neuron Menggunakan *Camellia sinensis* dengan bahan aktif EGCG pada *Rattus norvegicus* Model Stroke Iskemik Akut**

Stroke merupakan penyebab kematian kedua di dunia dan menyebabkan kematian 5,7 juta jiwa pada tahun 2005. Kebanyakan pasien stroke akan memiliki disabilitas sisa, walaupun sekitar 50-70% kembali *independence* secara fungsional. Terapi standar stroke iskemik akut saat ini adalah trombolisis, namun hanya sekitar 2-8.5% pasien stroke yang dapat dilakukan trombolisis di Amerika dan di dunia yang dilakukan trombolisis masih kurang dari 2%. Selama periode 1995-2015 telah terdapat 430 kandidat terapi stroke yang terbagi atas dua kategori yaitu agen trombolisis dan neuroprotektan.

Stroke akut akan terjadi penurunan aliran darah sehingga menyebabkan penurunan jumlah *Adenosine triphosphate* (ATP) yang diproduksi, hal ini akan menyebabkan terjadinya asidosis laktat dan akan menyebabkan hilangnya homeostasis ion pada sel neuron. Gangguan homeostasis ion ini akan menyebabkan kalsium dan *Adenosine diphosphate* (ADP) yang tinggi di dalam sel yang akan menstimulasi *Reactive oxygen species* (ROS) mitokondria dan sumber radikal bebas lain.

Protein HO-1 adalah *Heme oxygenase* yang dapat diinduksi oleh berbagai macam stimulus antara lain infeksi, logam berat, radiasi, demam, sitokin pro-inflamasi dan ox-LDL. *High mobility group protein-1* (HMGB-1) adalah faktor nuklear dan protein yang terikat protein, yang merupakan penanda stres pada sel. Beberapa studi menunjukkan bahwa HMGB-1 memiliki kapabilitas sebagai komponen pro-inflamasi yang merangsang produksi faktor inflamasi dan memiliki peran utama pada sepsis dan inflamasi yang disebabkan oleh Iskemia. TNFR1 adalah reseptor utama untuk transduksi signal dari TNF- $\alpha$  yang akan menyebabkan terjadinya nekrosis sel. Nekroptosis adalah mekanisme kematian sel yang dapat merangsang mekanisme inflamasi pada sistem imun. Inti dari proses nekroptosis memerlukan aktivasi dari *Receptor interacting serine/threonine kinase* (RIP3) dan juga aktivasi *pseudokinase mixed lineage kinase-like* (MLKL). RIP3 dapat diaktifkan oleh berbagai macam rangsangan terutama oleh TNF- $\alpha$  yang akan menginduksi terjadinya nekroptosis. Proses kematian sel akibat iskemia juga dapat melalui proses apoptosis dengan *Caspase-3* sebagai mediator kunci. Protein BCL-2 adalah regulator utama permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul proapoptosis.

Teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah minuman yang paling banyak dikonsumsi di dunia dan merupakan sumber *polyphenol* yang dikenal sebagai *catechin* termasuk diantaranya adalah *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) yang merupakan 63% dari total *catechin*. Sebuah meta-analisis menunjukkan bahwa individu yang mengkonsumsi  $\geq 3$  cangkir sehari memiliki risiko 21% lebih rendah

untuk mendapatkan serangan stroke dibandingkan yang mengonsumsi < 1 cangkir teh sehari. Didapatkan banyak penelitian pada model binatang yang menunjukkan bahwa pemberian EGCG pada jaringan otak yang mengalami iskemia-reperfusion akan menurunkan perluasan iskemia. EGCG juga merupakan *scavenger* radikal bebas yang kuat dan dapat menjaga sel neuron dari kerusakan oksidatif yang diinduksi oleh prooksidan. Pada beberapa model binatang, EGCG akan meningkatkan fungsi mitokondria dan menurunkan stres oksidatif pada perlemakan hati atau obesitas yang diinduksi oleh diet.

Jenis penelitian ini adalah *pre- post test design true experimental* yang dilakukan dengan menggunakan *Rattus norvegicus* jantan usia 4 bulan dengan berat badan 200-275 gram yang dilakukan oklusi MCA dan diberikan intervensi menggunakan EGCG dan ekstrak teh hijau. Sebelum dibuat model, subjek diperiksa klinisnya dengan pemeriksaan *Ladder Rung* dan *Y-Maze*. Model *Middle Cerebral Arteri Occlusion* (MCAO) dilakukan dengan cara dilakukan klem pada arteri karotis interna kanan menggunakan klem bulldog selama 180 menit. Setelah dibuat model MCAO selanjutnya secara random subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok yaitu kelompok kontrol, EGCG 10 mg/kgBB, EGCG 20 mg/KgBB, EGCG 30 mg/kgBB dan ekstrak teh hijau dengan label *Medittea*. Intervensi diberikan selama 7 hari dan sebelum subjek dikorbankan, dilakukan pemeriksaan *Ladder Rung* dan *Y-Maze*. Subjek kemudian diambil darahnya untuk pemeriksaan HMGB1 dan dikorbankan serta diambil sediaan jaringan otaknya untuk pemeriksaan imunohistokimia (IHC).

Hasil pemeriksaan pada subjek didapatkan penurunan ekspresi HO-1 pada kelompok intervensi, tidak didapatkan pengaruh intervensi terhadap kadar HMGB1, penurunan ekspresi TNFR1 dan RIP3, peningkatan ekspresi BCL-2, serta penurunan ekspresi *Caspase-3*. Tidak didapatkan pengaruh intervensi pada pemeriksaan *Ladder-Rung* hari ke-7 dan didapatkan pengaruh terhadap skor *Y-Maze* pada kelompok yang mendapatkan ekstrak teh hijau.

## SUMMARY

**Inhibition of Neuronal death using *Camellia sinensis* with it active compound EGCG in *Rattus norvegicus* Acute Ischemic stroke Model**

Stroke is the second leading death in the world dan cause of 5,7 Million death at 2005. Most of stroke patiens have residual disability, even 50-70% of stroke patiens will regain to functionally dependent. Standart acute stroke treatment is thrombolysis, but only 2-8,5% acute stroke patient receive this treatment in US and less than 2% in the world. There are 430 candidate for stroke treatment around 1995-2015 and divide to two category thrombolysis and neuroprotectant.

During acute ischemic stroke there is decrease in cerebral perfusion that will decrease Adenosine triphosphate (ATP) product. This will cause lactic acidosis and lost of ion homeostasis in neuronal cells. Ion homeostasis disfunction will cause high of Adenosine diphosphate (ADP) level in the cells and stimulate production of mitochondrial Reactive oxygen species (ROS) and other free radicals.

Heme oxygenase-1 (HO-1) is heme oxygenase induced by many kind of stimuli like infection, heavy metals, radiation, fever, pro inflammatory cytokine and ox-LDL. High mobility group protein-1 (HMGB1) is nuclear factors and binding protein as stress marker in the cells. Some study shows that HMGB1 have capability as pro inflammatory component ang trigger inflammatory product and have important role in sepsis and inflammation caused by ischemia. TNFR1 is main receptors for signal transduction from TNF- $\alpha$  that will trigger cellular necrotic. Necroptosis is cell death mechanism that will trigger inflammation and immune system. The principle of necroptosis need activation of Receptor interacting serine/threonine kinase (RIP3) and pseudokinase mixed lineage kinase-like (MLKL). RIP3 can be activated with many trigger especially TNF- $\alpha$  that will induce necroptosis. Mechanism of cellular death after ischemia can also be through apoptosis with Caspase-3 as key mediator. BCL-2 is main regulator of mitochondrial and proapoptosis molekules.

Green tea *Camellia sinensis*) is main consumed beverage in the world and main source of polyphenol knows as catechin including *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) that consist of 63% total catechin. A metaanalysis shows that people who consume more than 3 cups of tea every day have 21% lower risk of ischemic stroke compared to people who consume less than a cup of tea every day. There are many study in animal models shows that intervention using EGCG in the brain tissue after ischemic reperfusion insult will decrease ischemic brain tissue. EGCG also a strong scavenger of free radicals that will protect neuron from oxidative damage induced by pro-oxidant. Studi using animal models shows that EGCG will improve mitochondrial function and decrease oxidative stress in fatty liver or diet induced obesity.

This study is pre- post test true experimental design in male *Rattus norvegicus* 4 month old with body weight 200-275 gram perform *Middle Cerebral Arteri Occlusion* (MCAO) and intervention using EGCG and green tea extract. Subject examine ladder rung and Y-Maze before performing MCAO models. MCAO model using bulldog klem in internal carotic artery for 180 minutes and after models was establish subject will randomly allocated in to five groups, control,

EGCG 10 mg/kgBw, EGCG 20 mg/KgBW, EGCG 30 mg/KgBw and green tea extract with label *Medita*. Intervention is perform for 7 days and before subject were sacrifice, ladder rung and Y-Maze is examined for all subject. Subject then take its blood for HMGB1 examination and sacrifice then take its brain tissue for immunohistochemistry (IHC) examination.

There are decrease in HO-1 expression in intervention groups, no effect on HMGB1 in intervention groups, decrease in TNFR1 and RIP3 expression, increase of BCL-2 expression and decrease in Caspase-3 expression. There is no effect in ladder rung on 7<sup>th</sup> day examination and there is improvement in Y-Maze score in extract green tea groups.

**ABSTRACT****INHIBITION OF NEURONAL CELL DEATH USING *Camellia sinensis* WITH ITS ACTIVE COMPOUND EGCG IN *Rattus norvegicus* ACUTE ISCHEMIC STROKE MODEL**

**Background:** Stroke is the most prevalent neurological disorders in the world. During ischemic stroke there is increasing oxidative stress that will cause cell death through apoptosis and necroptosis pathways.

**Methods:** We perform in vivo study using male *Rattus Norvegicus* within 5 groups, control MCAO, EGCG 10 mg/kgBB, EGCG 20 mg/kgBB, EGCG 30 mg/kgBB, and extract green tea 30 mg/kgBB. Before performing MCAO models all study subject examine for Ladder Rung, and Y-Maze. We perform MCAO model using clamping carotid artery for 180 minutes. All groups are treated for 7 days and at day 7<sup>th</sup> we perform ladder rung and Y maze examination before research subject is sacrifice and examine HMGB1 using ELISA methods, and IHC for HO-1, TNFR1, RIP3, BCL-2 and Caspase-3.

**Result:** There is significant different in all intervention group compared to control group on HO-1 ( $p < 0,05$ ). There is no significant different in all groups compared to control group in HMGB1. There is also significant different in all intervention group started at EGCG 20 mg/kgBW compared to control group on TNFR1 ( $p < 0,05$ ), significant different for RIP3 started at EGCG 20 mg/kgBW and extract green tea group ( $p < 0,05$ ), BCL-2 for all intervention group ( $p < 0,05$ ), Caspase-3 at EGCG 30mg/kgBW ( $p = 0,004$ ) and green tea extract group ( $p = 0,019$ ). There are no significant different on ladder rung at days 7<sup>th</sup> for all groups. There is also significant different in Y-Maze Score at green tea extract groups ( $p = 0,048$ ). There is significant correlation between HO-1 and BCL-2 ( $r = -0,655$ ;  $p = 0,000$ ), BCL-2 and Caspase-3 ( $r = -0,5$  ;  $p = 0,000$ ), Caspase-3 and Y-Maze ( $r = 0,332$ ;  $p = 0,001$ ), TNFR1 and RIP3 ( $r = 0,551$ ;  $p = 0,000$ ) and we didn't find correlation between HMGB1 and TNFR1 ( $r = 0,029$ ;  $p = 0,838$ ), RIP3 and Y-Maze ( $r = 0,18$ ;  $p = 0,167$ ).  
**Conclusion:** Green tea with its active compound EGCG can inhibit neuronal cell death through apoptosis and necroptosis pathways in MCAO models.

Key words: MCAO, *Camellia sinensis*, extract green tea, EGCG, HO-1, TNFR1, RIP3, BCL-2, *Caspase-3*, *Ladder Rung*, *Y-Maze*





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET, DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131  
Telp. (031) 5020251, 5030252, 5030253 Faks. 5022472  
website : <http://www.fk.unair.ac.id>; email : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

Nomor : 6201/UN3.1.1/DL/2021

28 September 2021

Lamp :

Hal : Penyanggah Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Kepada Yth.

Pimpinan Sidang Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor FK UNAIR  
Surabaya

Sehubungan dengan Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka) an. **Medhi Denisa Alinda, dr., Sp.KK** pada tanggal **19 Oktober 2021**, maka dengan ini kami sampaikan nama-nama penyanggah ujian akhir yang bersangkutan untuk diketahui.

Pimpinan sidang ujian akhir terbuka: Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS

Para penyanggah dimaksud adalah :

1. Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswo, dr., Sp.KK(K), FINSDV, FAADV \*) —
2. Dr. Anang Endaryanto, dr., Sp.A(K) \*\*) —
3. Dr. M. Yulianto Listiawan, dr., Sp.KK(K), FINSDV, FAADV \*\*\*) —
4. Prof. Soetjipto dr., M.S., Ph.D —
5. Muhammad Miftahussurur, dr, Sp.PD., M.Kes., Ph.D, FINASIM —
6. Dr. I Gusti Nyoman Darmaputra, dr., Sp.KK(K), FINSDV, FAADV —
7. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr., Sp.KK(K), FINSDV, FAADV —
8. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh —
9. Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS —

Demikian dan atas perhatiannya disampaikan terima kasih.

a.n.Dekan  
Wakil Dekan I,

Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS  
NIP. 197609022008011009 ✓

Catatan :

- \*) Promotor
- \*\*) Ko-Promotor I
- \*\*\*) Ko-Promotor II

**DISERTASI**

**MEKANISME PENYEMBUHAN ULKUS PLANTAR KRONIS KUSTA**

**MENGGUNAKAN TOPIKAL *OINTMENT***

**(*ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL –***

***CONDITIONED MEDIUM*)**

**ADMSC-CM**



**MEDHI DENISA ALINDA**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2021**

**DISERTASI**

**MEKANISME PENYEMBUHAN ULKUS PLANTAR KRONIS KUSTA  
MENGUNAKAN TOPIKAL OINTMENT**

**(ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL - CONDITIONED**

***MEDIUM*)**

**ADMSC-CM**



**MEDHI DENISA ALINDA**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2021**

**DISERTASI**

**MEKANISME PENYEMBUHAN ULKUS PLANTAR KRONIS KUSTA**

**MENGGUNAKAN TOPIKAL *OINTMENT***

**(*ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL - CONDITIONED***

***MEDIUM***)

**ADMSC-CM**

**MEDHI DENISA ALINDA**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2021**

**MEKANISME PENYEMBUHAN ULKUS PLANTAR KRONIS KUSTA**

**MENGGUNAKAN TOPIKAL *OINTMENT***

**(*ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL - CONDITIONED***

***MEDIUM*)**

**ADMSC-CM**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh gelar Doktor**

**Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor**

**Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**MEDHI DENISA ALINDA**

**011817017322**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**SURABAYA**

**2021**

# LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

MEKANISME PENYEMBUHAN ULKUS PLANTAR KRONIS KUSTA  
MENGUNAKAN TOPIKAL OINTMENT (*ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM  
CELL-CONDITIONED MEDIUM*) ADMSC-CM :

YANG TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 5 JUNI 2021

Oleh :

Promotor



Prof. Dr. Cita RS Prakoeswa, dr, SpKK(K), FINSDV, FAADV  
NIP. 196708041997032002

Kopromotor I



Dr. Anang Endaryanto, dr, Sp.A(K)  
NIP. 19630423198901 1003

Kopromotor II



Dr. M. Yu. lianto Listiawan, dr, SpKK(K), FINSDV, FAADV  
NIP. 19610722198703 1 006

Mengetahui  
KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor



Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr, SpOG(K)  
NIP. 196108172016016101

**Penilaian Naskah Untuk Disertasi Ini Telah Disetujui Untuk Diuji Dan**

**Dinilai Oleh Panitia Penguji Pada Tanggal 21 Juli 2021**

**Panitia penguji :**

**Ketua** : 1. Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr., SpKK (K),  
FINSDV, FAADV

**Anggota** : 2. Dr. Anang Endaryanto, dr., Sp.A(K)  
3. Dr. M. Yulianto Listiawan, dr., SpKK(K), FINSDV, FAADV  
4. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes  
5. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh  
6. Dr. Heri Suroto, dr., Sp.OT(K)  
7. Dra. Esti Hendradi, Apt., M.Si., Ph.D

## UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirahiim..

Puji syukur kehadirat Allah SWT, penulis dapat menjalani proses pendidikan, penelitian dan penyusunan disertasi yang berjudul Mekanisme Penyembuhan Ulkus Plantar Kronis Kusta dengan Menggunakan Topikal *Ointment Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell- Conditioned Medium* (ADMSC-CM).

Terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Promotor penulis, Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr., SpKK(K), FINS DV, FAADV yang terus menerus memberikan bimbingan dan menyemangati penulis untuk berjuang dalam menjalani dan menyelesaikan pendidikan S3.
2. Ko Promotor I penulis, Dr. Anang Endaryanto, dr., Sp.A(K) yang telah memberikan arahan dan bimbingan yang bermanfaat bagi penulis.
3. Ko Promotor II penulis, Dr. M. Yulianto Listiawan, dr., SpKK(K), FINS DV, FAADV yang selalu memberikan dukungan, masukan dan saran kepada penulis.
4. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Moh. Nasih, S.E., MT., Ak., beserta jajaran rektorat atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. Budi Santoso, dr., SpOG(K), beserta jajaran dekanat, atas peluang dan sarana prasarana yang diberikan kepada penulis.



6. Direktur Utama RSUD Dr. Soetomo Dr. Joni Wahyudi, dr., Sp.BS(K), beserta jajaran direksi, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian di Unit Rawat Jalan Kulit dan Kelamin, Instalasi Bank Jaringan dan Instalasi Farmasi.
7. Direktur Utama Rumah Sakit Universitas Airlangga Prof. Dr. Nasronudin, dr., SpPD.,KPTI-FINASIM yang telah memberikan dukungan dan bimbingan kepada penulis untuk menempuh pendidikan S3.
8. Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr. Soetomo Surabaya, khususnya dr. Heri Suroto, dr., SpOT (K) dan tim yang telah membantu memberikan bahan penelitian dan dukungan untuk penulis selama melakukan penelitian.
9. Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K) yang telah memberikan kesempatan penulis untuk menempuh pendidikan S3.
10. Tim Penguji yaitu, Prof. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa. dr. SpKK(K), FINS DV, FAADV, Dr. Anang Endaryanto, dr., Sp.A(K), Dr. M. Yulianto Listiawan. dr., SpKK(K), Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh, Dra. Esti Hendradi, Apt. M.SI. Ph.D, Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes, Dr. Heri Suroto, dr. Sp.OT(K) atas kesediannya meluangkan waktu untuk membaca dan mengoreksi naskah disertasi, menguji, memberikan bimbingan, dan asupan guna menyempurnakan hasil dari penelitian ini. Semoga ilmu yang diperoleh dari para guru dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu penulis di kemudian hari.

11. Semua staf pengajar pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu dasar dan ilmu terapan yang sangat bermanfaat.
12. Seluruh Staf dari Departemen/KSM Dermatologi dan Venereologi yang telah mendukung dan memberi kesempatan untuk menempuh S3.
13. Seluruh Staf dari KSM Kulit dan Kelamin Rumah Sakit Universitas Airlangga Surabaya yang telah mendukung dalam menempuh studi S3.
14. Dr. Reni I'tishom, S.Pi., M.Si, Adhdriyani, SE, Fitriya Diah Isnaini, A.Md, Paramita Kurnia Sari, A.Md, dan Shobki Mafakhir, S.Kom, yang telah memberikan dukungan dan membantu kelancaran administrasi selama pendidikan.
15. Seluruh rekan Angkatan 2018 pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, terutama Dr. Flora Ramona Sigit Prakoeswa, dr., M.Kes, Sp.KK, Dipl.STD.HIV, FINS DV, Winawati Eka Putri, dr., SpKK, Regita Indira Agusni, dr., SpKK, dr. Radityastuti, SpKK, FINS DV, para sahabat perjuangan yang saling memotivasi.
16. Ayahanda tercinta Prof. Dikman Angsar, dr., SpOG (K) yang menjadi panutan terbaik bagi penulis dan selalu menjadi sumber inspirasi serta motivasi penulis yang mendidik penulis hingga sampai saat ini.
17. Ibunda tercinta, Irmawati, dr.,M.Kes, yang telah mengandung, melahirkan mengasuh, mendidik, mengasihi, memberi nasihat dan senantiasa mendoakan penulis tanpa lelah hingga saat ini.

18. Mertua tercinta Bapak Bagindo Yusuf Bamban dan Ibu Delva Rais yang telah mendukung, memberi nasihat dan senantiasa mendoakan penulis hingga saat ini
19. Saudara-saudari penulis yaitu Naya Rini S.E, Dr. Muh.Aldika Akbar, dr., SpOG(K), Muh.Valeri Al Hakim, dr., Sp.M, Renata Prameswari, dr., SpKK, Erni Imelda S.E atas doa, semangat dan dukungannya kepada penulis selama ini. Terima kasih karena telah saling menemani, memotivasi dan saling menyayangi dalam perjuangan hidup.
20. Suami penulis Rameshdo Yuanda, dr., Sp.U yang selalu mendukung dan menyemangati dan mendampingi penulis dalam melanjutkan studi S3. Terima kasih banyak atas kesabaran dan ketulusannya.
21. Ketiga buah hati penulis Queen Merci Mireille Laquisha, Muhammad Tegar Jelajah Benua dan Muhammad Tangguh Arung Samudra yang menjadi salah satu motivasi penulis untuk menyelesaikan pendidikan S3.
22. Untuk teman saya di Rumah Sakit Universitas Airlangga Erika Marfiani, dr., Sp.PD, Sita Setyowatie, dr., SpS, Nia Rachmawati, dr., SpJP, Andini Dyah Sitawati, dr., SpKJ, Erreza.R, dr., SpOT, Yoki, dr., SpOT
23. Untuk alumni PPDS Kulit FK Unair Pedia Primadianti, dr., SpKK, Lita Setyowatie, dr., SpKK yang banyak memotivasi meskipun jauh
24. Dr.Wibi Riaawan S.Si dari Departemen Biologi Molekular Universitas Brawijaya yang sudah membantu dalam penelitian ini.
25. Bapak Shokib dari Liponsos Babat Jerawat yang membantu dalam penelitian ini.

26. Para anggota penelitian yang sudah bekerja sama dengan baik dengan penulis sejak awal penelitian hingga saat ini , Ibu Eri, PPDS Kulit dan Kelamin (dr. Diah Ngesti, dr. Arifia, dr Karine, dr. Amira, dr. Felix, dr.Fina dan dr. Ira ), dr. Caminda Amanda Prakoeswa, dr.Kartika Misalina, dr. Mario dan dr.David

27. Akhir kata, penulis mendoakan semoga Allah SWT melimpahkan keberkahan dan membalas kebaikan semua pihak yang terlibat dan turut berjasa dalam penyelesaian disertasi ini.

Penulis juga mohon maaf kepada semua pihak, apabila menempuh pendidikan dan penelitian S3 ini sekiranya ada hal-hal yang kurang berkenan. Semoga penulis dapat memperbaiki diri untuk menjadi orang yang lebih baik di kemudian hari. Semoga hasil peneltian ini bermanfaat bagi orang banyak.

Surabaya, 10 Juli 2021

Penulis

## **RINGKASAN**

### **MEKANISME PENYEMBUHAN ULKUS PLANTAR KRONIS KUSTA MENGUNAKAN TOPIKAL OINMENT *ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL-CONDITIONED MEDIUM (ADMSC-CM)***

Ulkus plantar kronis kusta merupakan ulkus yang terjadi karena kerusakan fisik akibat peradangan *granulomatous Mycobacterium lepra*. Ulkus yang sering dialami oleh pasien kusta adalah ulkus plantar, sekitar 10% hingga 20% dengan kusta mengalami ulkus plantar. Berdasarkan data WHO, tahun 2018 setidaknya 208.619 kasus baru dilaporkan dari 127 negara. Di Indonesia setidaknya 15.920 kasus baru kusta yang dilaporkan tahun 2017. Hal ini disebabkan karena kondisi sebagian besar beban tubuh tertumpu pada bagian depan serta dengan bagian penonjolan tulang pada kaki, sehingga ulkus terjadi paling sering pada area tersebut. Ulkus pada kusta yang dibiarkan terus menerus sering kali terjadi infeksi sehingga menyebabkan kerusakan parah dan menjadi ulkus neuropatik.

Proses inflamasi yang terus menerus menjadikan ulkus menjadi kronis. Perawatan ulkus yang kurang adekuat pada pasien kusta dapat meningkatkan risiko kambuh-kambuhan dan timbulnya komplikasi yang lebih berat. Penyembuhan ulkus yang kurang maksimal akan dapat menyebabkan infeksi dan dapat menimbulkan amputasi sehingga mengganggu kualitas hidup pasien. Manajemen ulkus plantar kronis kusta merupakan suatu tantangan di bidang kesehatan karena menjadi luka yang terabaikan dari perjalanan penyakit kusta. Beberapa metode pengobatan telah dikembangkan tetapi hasilnya kurang memuaskan. Penyembuhan

ulkus plantar kronis kusta memerlukan waktu cukup lama karena terjadi penurunan *growth factor* seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF) dan *transforming growth factor-β* (TGF- β) yang dibutuhkan untuk penyembuhan luka.

Saat ini telah banyak produk perawatan luka yang tersedia, namun masih sangat sedikit terapi yang menggabungkan efek menguntungkan dari *mesenchymal stem cell* (MSC) pada proses penyembuhan luka. Penggunaan *Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium* (ADMSC-CM) merupakan salah satu pilihan terapi dalam *algoritma* manajemen ulkus. ADMSC-CM merupakan kumpulan beberapa faktor solubel yaitu sitokin, kemokin dan *growth factor*. ADMSC-CM pertama kali diisolasi dari sum-sum tulang tahun 1970 dan saat ini telah berhasil diisolasi dari beberapa sumber seperti jaringan adiposa, membran amnion dan *Wharton's jelly*. ADMSC-CM telah digunakan secara eksogen untuk diaplikasikan pada luka untuk bekerja pada proses penyembuhan luka. ADMSC-CM telah dilaporkan mempunyai efek positif pada proses penyembuhan luka. ADMSC-CM dapat digunakan sebagai terapi pilihan untuk penyembuhan luka akut dan kronis. Sel punca mesenkimal mampu menghasilkan beberapa bahan bioaktif yang mengandung *growth factor* dan sitokin yaitu EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*Platelete Derived Growth Factor*), VEGF. (*Vascular Endhotelial Growth Factor*), TGF-β (*Transforming Growth Factor Beta*), IL-10. Bahan-bahan aktif dari *growth factor* tersebut yang akan membantu mempercepat proses penyembuhan luka.

Penelitian ini adalah *randomized single blind control trial*, dimana pasien ulkus plantar kronis kusta dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol yang diberikan dengan pengobatan *farmazetin gauze dressing* (FGD) dan kelompok perlakuan yaitu pengobatan dengan ADMSC-CM yang diberikan selama 8 minggu diberikan setiap 3 hari sekali maksimal sebanyak 14 kali dan diamati ukuran luas ulkus dan kedalaman luka. Tempat penelitian berada di Unit Rawat Jalan Divisi Kusta RSUD Dr.Soetomo Surabaya, pembuatan topikal *ointment* berada di Instalasi Farmasi RSUD Dr.Soetomo Surabaya, pembuatan cairan *secretome* ADMSC di Laboratorium Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr.Soetomo dan pembacaan preparat imunohistokimia dan histopalagi anatomi di Departemen Biomolekuler Universitas Brawijaya, Malang. Pada awal penelitian dilakukan pemeriksaan ELISA untuk mengetahui kadar *growth factor* yang terdapat dalam *secretom* ADMSC kemudian pada awal dan akhir penelitian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk ekspresi IL-1, TGF- $\beta$ 1, dan pemeriksaan histopatologi dengan melihat jumlah sel makrofag, sel granulosit, sel neutrofil, sel fibroblas, dan neovaskularisasi.

Analisis statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk*, analisis komparasi delta antar kelompok menggunakan *Independent T-test* dan analisis komparasi sebelum dan sesudah perlakuan menggunakan *Paired T-test*. Hasil analisis dengan nilai  $p < 0,005$  dianggap signifikan. Pada penelitian ini didapatkan bahwa luas ulkus pada kelompok SC pada minggu ke-2 sampai minggu ke-8 nilai *p-value* didapatkan perbedaan signifikan, sedangkan pada kedalaman ulkus pada

minggu ke-3 sampai minggu ke-8 nilai *p-value* dinyatakan terdapat perbedaan signifikan.

Hasil pemeriksaan kadar *growth factor* (GF) menggunakan ELISA didapatkan kadar PDGF yang paling tinggi diikuti berturut-turut VEGF, TGF- $\beta$ 1, dan EGF. Hasil analisis dengan nilai  $p < 0,05$  dianggap signifikan. Pada penelitian ini didapatkan data Hasil uji statistik variabel dari ekspresi TGF- $\beta$ 1 jika dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan SC dengan menggunakan uji *Paired-T test* tidak terdapat perbedaan yang bermakna dan analisis uji delta dengan *Independent T-test* tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji statistik data variabel dari ekspresi IL-1 jika dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan kelompok SC dengan menggunakan uji *Paired T-test* tidak terdapat perbedaan yang bermakna dan analisis delta menggunakan uji *Independent T-test* tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan, dimana *mean* pada *post* perlakuan pada kelompok SC nilainya lebih kecil.

Hasil uji statistik data variabel sel makrofag dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan kelompok SC dengan menggunakan uji *Paired T-test* terdapat perbedaan yang signifikan dan analisis komparasi delta dengan menggunakan uji *Independent T-test* terdapat perbedaan signifikan dimana didapatkan nilai *mean* pada kelompok SC lebih besar dari kelompok S.

Hasil uji statistik data variabel sel granulosit dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan kelompok SC dengan menggunakan uji *Paired T-test* terdapat perbedaan signifikan pada kelompok SC dan analisis komparasi delta



dengan uji *Independent T-test* terdapat perbedaan yang signifikan, hasil mean delta sel granulosit terdapat penurunan pada kelompok SC

Hasil uji statistik data variabel sel neutrofil dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan kelompok SC dengan menggunakan uji *Paired T-test* didapatkan perbedaan bermakna dimana kelompok S lebih kecil dan analisis komparasi delta didapatkan nilai signifikansi dengan mean kelompok SC lebih kecil dibandingkan kelompok S

Hasil uji statistik data sel fibroblas dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan kelompok SC dengan menggunakan uji *Paired T-test* tidak terdapat perbedaan signifikan, sedangkan analisis komparasi delta dengan uji *Independent-T* test didapatkan perbedaan yang signifikan dimana nilai mean kelompok Sc lebih besar saat setelah diberi perlakuan.

Hasil uji statistik neovaskularisasi dilakukan analisis komparasi antar kelompok S dan kelompok SC dengan menggunakan uji *Paired T-test* terdapat perbedaan signifikan pada kelompok SC sedangkan analisis uji komparasi delta dengan uji *Independent T-test* terdapat perbedaan signifikan dengan mean kelompok SC lebih besar dibandingkan kelompok S

Pada analisis jalur didapatkan pengaruh secara positif nilai ADMSC-CM terhadap sel makrofag, neovaskularisasi dan ukuran luas ulkus. Adanya hubungan variabel antara ADMSC-CM pada jumlah sel markofag dan memberikan efek positif juga pada sel fibroblas dengan nilai  $\beta=0,657$ . Pemberian ADMSC-CM pada subyek penelitian terbukti memberikan efek mengecilkan ukuran luas luka, hasil ini dapat dilihat dari nilai  $\Upsilon$  (Gama) antara ADMSC-CM ke luas luka bernilai

negatif yaitu sebesar -0,390 yang berarti dengan pemberian ADMSC-CM pada kelompok SC akan mengecilkan luas luka sebesar 0,390 dibandingkan dengan kelompok S hasil ini dinyatakan bermakna signifikan dikarenakan nilai p-value nya didapatkan 0,001 dimana nilai tersebut  $<0,05$ . Pemberian ADMSC-CM juga memberikan efek positif secara langsung terhadap neovaskularisasi dengan nilai  $\Upsilon = 0,657$

Keterbatasan pada penelitian ini yaitu belum memeriksa variabel lain yang terkait dengan penyembuhan ulkus plantar kronis kusta. Pemeriksaan histopatologi hanya terbatas pada lapisan epidermis, kandungan GF yang diperiksa hanya PDGF, EGF, VEGF dan TGF-  $\beta 1$ . Dan penelitian ini dilakukan pada manusia sehingga membutuhkan KIE yang dilakukan berulang-ulang kepada subyek supaya mengikuti anjuran penelitian.

Saran untuk penelitian lebih lanjut adalah melakukan pemeriksaan lebih lanjut menggunakan variabel lain yang berperan dalam patogenesis penyembuhan ulkus plantar kronis kusta dan melanjutkan penelitian dengan menggunakan jenis topikal yang lain seperti krim atau gel sebagai terapi alternatif.

## SUMMARY

### **HEALING MECHANISM OF CHRONIC PLANTAR ULCER USING *ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL-CONDITIONED MEDIUM (ADMSC-CM) TOPICAL OINMENT***

Leprosy chronic plantar ulcers are ulcers that occur due to physical damage caused by granulomatous inflammation of *Mycobacterium lepra*. Ulcers that are often experienced by leprosy patients are plantar ulcers, where about 10% to 20% leprosy sufferers have plantar ulcers. Based on WHO data, in 2018, at least 208,619 new cases were reported from 127 countries. In Indonesia, at least 15,920 new cases of leprosy were reported in 2017. This is due to the condition that most of the body's weight centered on the front and the protrusion of the bones in the legs, so ulcers occur most often in those areas. Ulcers in leprosy prolongedly left untreated often become infected, causing severe damage, and becoming neuropathic ulcers.

The incessant inflammatory process/response makes the ulcer chronic. Inadequate ulcer care in leprosy patients can increase the risk of recurrence and the emergence of more severe complications. Ulcer healing that is less than optimal will lead to infection and can lead to amputation, thus disrupting the patient's quality of life. Management of leprosy chronic plantar ulcers is a challenge in the health sector because it is often neglected throughout the course of the disease. Several treatment methods have been developed but the results are not satisfactory. Healing of leprosy chronic plantar ulcers takes a long time because there is a decrease in

growth factors such as *platelet-derived growth factor* (PDGF) and *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), which are needed for wound healing.

While many wound care products are available, very few therapies combine the beneficial effects of *mesenchymal stem cells* (MSCs) on the wound healing process. The use of *Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium* (ADMSC-CM) is one of the therapeutic options in ulcer management. ADMSC-CM is a collection of several soluble factors, namely cytokines, chemokines, and growth factors. ADMSC-CM was first isolated from bone marrow in 1970 and has now been isolated from several sources such as adipose tissue, amniotic membrane, and Wharton's jelly. ADMSC-CM has been used exogenously on wounds to aid the wound healing process. It has been reported to have a positive effect on the wound healing process, thus it can be used as the therapy of choice for acute and chronic wound healing. Fat tissue is known to be a source of multipotent stem cells and is widely used for the treatment of degenerative diseases and burns. Compared to metabolite products from bone marrow, the procedure is easier. Mesenchymal stem cells can produce several bioactive ingredients that contain growth factors and cytokines, namely *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor-  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), and IL-10. The active ingredients of these growth factors will help accelerate the wound healing process.

This study was a randomized single blind control trial, in which leprosy patients with chronic plantar ulcer were divided into two groups, namely the group given control treatment S (Farmazetin Gauze Dressing) and treatment with SC

treatment group (ADMSC-CM), both treated once every week for 8 weeks. The size and depth of the wound are observed weekly. The research site is in the Outpatient Unit of the Leprosy Division of RSUD Dr. Soetomo Surabaya. The topical *ointments* were manufactured at the Pharmacy Installation of the RSUD Dr. Soetomo Surabaya, and ADMSC secretome fluid at the Tissue Bank Laboratory of the RSUD Dr. Soetomo. Immunohistochemical and histopathological preparations were observed at the Department of Biomolecular Brawijaya University, Malang. Prior to the study, an ELISA examination was carried out to determine the levels of growth factors contained in ADMSC secretomes. At the beginning and end of the study, immunohistochemical examination of IL-1, TGF- $\beta$ 1, and histopathological examination were carried out, namely macrophage cells, granulocyte cells, neutrophil cells, fibroblast cells, and vascularisation.

Statistical analysis using were done with the Shapiro-Wilk normality test, Independent T test for comparative analysis between groups and Paired T-test for comparative analysis pre and post treatment. The results of the analysis with a p value of  $<0.005$  were considered significant. It was found that the mean value of ulcer area in the SC group 2nd to 8th week of treatment had a significant difference (to that of the S group?), while the mean ulcer depth at the 3rd to the 8th week indicated a significant difference (with the S group).

The results of the examination of GF levels using ELISA showed that the highest is PDGF levels were followed by VEGF, TGF- $\beta$ 1 and EGF. The results of the analysis with a p value of  $< 0,05$  were considered significant. Paired-T test indicated no significant difference in mean TGF- $\beta$  expression between S and SC

groups. Similarly, independent-T test showed no significant difference in mean TGF- $\beta$  expression between pre and post treatment groups.

Paired-T test of mean IL-1 expression between the S group and the SC group resulted in no significant difference. Likewise, the Independent T-test test did not find any significant difference between mean IL-1 expression of the pre and post treatment groups, where the mean post-treatment in the SC group is lower.

The same tests for corresponding groups were carried out on the mean macrophage cell count. Both tests showed significant difference in mean of macrophage cell count between S and SC, and pre and post treatment groups using paired-T test and independent-T test, respectively. The mean macrophage cell count of SC is bigger than the S group.

Comparative analysis between mean granulocyte count of the S group and the SC group was carried out using the Paired T-test which indicated a significant difference in the SC group, while comparative analysis for delta pre and post treatment groups was carried out with the Independent T-test which showed a significant difference in the SC group before being given treatment.

Similar to mean granulocyte count, comparative analysis of mean neutrophil cell count between the S group and SC that was done with the Paired T-test, showed a significant difference where the S group was lower. Comparative analysis for delta pre and post treatment groups indicated there were significant differences in the SC group before being given treatment.

The statistical tests were also done for mean fibroblast cell count, using paired-T test for comparative analysis for delta between the S group and the SC

group and independent-T test for comparative analysis between pre and post treatment groups. Both tests showed no significant difference. The mean value of the SC group was greater after being given treatment.

Lastly, the analysis was also done for vascularization data using the paired-T test for comparative analysis between the S group and the SC group, with a significant difference in the SC group. The independent-T test was used for comparative delta analysis between pre and post treatment groups. There was a significant difference in the post treatment SC group.

Path analysis showed a positive effect of ADMSC-CM values on, macrophage cells and neovascularisation ulcer area. The magnitude of the effect of ADMSC-CM was indicated positively to macrophage cell and showed positive effect to fibroblast cell with  $\beta=0,657$  value. The magnitude of the influence of ADMSC-CM obtained  $\gamma -0,390$  showed that giving ADMSC-CM can reduce ulcer size until 0,390 and significantly result with p- value 0,001. And the magnitude of ADMSC-CM can give postively value with  $\gamma =0,65$  in neovascularization.

This study observed a limited number of variables. Other variables related to the healing of leprosy chronic plantar ulcers are not included. In addition, this research was carried out on humans which required communication, information, and education (CIE), carried out repeatedly to the subjects to ensure the adherence to research recommendations.

Suggestions for further research are to conduct further investigations on other variables that play a role in the pathogenesis of leprosy chronic plantar ulcer healing and to continue research using other types of topical treatments such as

creams or gels as alternative therapy. Other variables that play a role in the pathogenesis of leprosy chronic plantar ulcer healing could be of interest for further research, in addition to the usage of other types of topical treatments such as creams or gels as alternative therapy.



## ABSTRAK

### **Mekanisme Penyembuhan Ulkus Plantar Kronis Kusta menggunakan *Adipose Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium (ADMSC-CM)***

**Latar Belakang:** Ulkus plantar kronis kusta merupakan ulkus yang terjadi karena kerusakan fisik akibat peradangan granulomatous *Mycobacterium lepra*. Ulkus yang sering dialami oleh pasien kusta adalah ulkus plantar, sekitar 10% hingga 20% dengan kusta mengalami ulkus plantar. Penggunaan *adipose derived mesenchymal stem cell-conditioned medium (ADMSC-CM)*. Beberapa penelitian menyebutkan ADMSC-CM efektif dalam proses penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh ADMSC-CM dalam bentuk topikal *ointment* dengan mengevaluasi ekspresi TGF- $\beta$ , dan IL-1 dari pemeriksaan imunohistokimia dan sel makrofag, sel neutrofil, sel granulosit dan vaskularisasi dari pemeriksaan histopatologi serta pemeriksaan ELISA untuk mengetahui kadar EGF, PDGF, VEGF dan TGF- $\beta$  dari secretome ADMSC-CM

**Metode:** Total 32 pasien ulkus plantar kronis kusta pada penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol (S) terdiri dari 16 subyek penelitian diberikan pengobatan standart yaitu *farmazetin gauze dressing (FGD)* sedangkan pada kelompok perlakuan (SC) sebanyak 16 subyek diberikan topikal *ointment ADMSC-CM*. Pemberian pengobatan dilakukan selama 8 minggu ,setiap 1xseminggu diukur luas dan kedalaman dari ulkus.

**Hasil:** Pada penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada luas ulkus pada minggu ke 2 sampai ke 8, kedalaman ulkus pada minggu ke 3 sampai ke 8, sel makrofag, sel granulosit, sel neutrofil sel fibroblas dan neovaskularisasi. Hasil pemeriksaan kadar *growth factor* menggunakan ELISA menunjukkan kadar tertinggi yaitu PDGF berturut-turut diikuti VEGF, TGF- $\beta$ 1, dan EGF

**Kesimpulan:**Topikal *ointment* ADMSC-CM menunjukkan penurunan luas ulkus dan kedalaman ulkus, peningkatan sel makrofag, sel neutrofil, sel granulosit dan vaskularisasi. ADMSC-CM bisa dijadikan terapi dalam proses penyembuhan ulkus plantar kronis kusta.

**Kata Kunci:** ulkus plantar kronis kusta, ADMSC, EGF, PDGF, VEGF, TGF-  $\beta$ .



UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Sumbaya 60131  
Telp. (031) 5020251, 5030252-3 Fax. (031) 5022472  
Laman: <http://www.fk.unair.ac.id> e-mail: [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

Nomor : 2535 /UN3.1.1/DL/2022

9 Maret 2022

Lamp :

Hal : Penyanggah Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Kepada Yth.

Pimpinan Sidang Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor FK UNAIR

Surabaya

Sehubungan dengan Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka) an. **Etty Hary Kusumastuti, dr., Sp.PA(K), FIAC** pada tanggal **17 Maret 2022**, maka dengan ini kami sampaikan nama-nama penyanggah ujian akhir yang bersangkutan untuk diketahui.

Pimpinan sidang ujian akhir terbuka: Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG(K)

Para penyanggah dimaksud adalah :

1. Prof. Dr. I Ketut Suidana, drs., M.Si \*) ✓
2. Dr. Muhtarum Yusuf., dr., Sp.THT-KL(K), FICS \*\*) ✓
3. Prof. Dr. Ambar Mudigdo, dr., Sp.PA(K) ✓
4. Prof. Dr. Ami Ashariati, dr., Sp.PD., K-HOM., FINASIM ✓
5. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr., Sp.KK(K), FINSDV., FAADV ✓
6. Dr. Dwi Apriliawati, dr., M.Kes., Sp.GK ✓
7. Dr. Hanik Badriyah Hidayati, dr., Sp.N(K) ✓
8. Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes ✓
9. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG(K) ✓

Demikian dan atas perhatiannya disampaikan terima kasih.



Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS  
NIP. 197609022008011009

Catatan :

- \*) Promotor
- \*\*) Ko-Promotor I
- \*\*\*) Ko-Promotor II

**DISERTASI**

**PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS  
PADA JARINGAN BIOPSI**



**ETTY HARY KUSUMASTUTI**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2022**

**PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS  
PADA JARINGAN BIOPSI**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
dan ditetapkan di hadapan Panitia Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)**

**Oleh:**

**ETTY HARY KUSUMASTUTI**

**011617017337**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2022**

## LEMBAR PENGESAHAN

PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPON BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS PADA  
JARINGAN BIOPSI

TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 1 MARET 2022

Oleh:  
Promotor



Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M. Si  
NIP. 19550705 198003 1 005

Kopromotor



Dr. Muhtarum Yusuf, dr. Sp. THT KL (K), FICS  
NIP. 19620831 198903 1 010

Mengetahui

KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor



Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr. Sp OG (K)  
NIP. 19610817 2016016101

Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai  
oleh panitia penguji pada Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)  
pada tanggal 16 Februari 2022

**PANITIA PENGUJI**

Ketua : Dr. Gondo Mastutik, drh., M. Kes  
Anggota : Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M. Si  
Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp. THT KL (K), FICS  
Prof. Dr. Bambang Suprijanto, dr., Sp. Rad (K)  
Dr. Karyono Mintarum, dr., Sp. PA  
Dr. Imam Susilo, dr., Sp. PA (K), FISCAM  
Dr. Desak Gede A. Suprabawati, dr., Sp. B (K) Onk  
Dr. H. Budi Utomo, dr., M. Kes

## PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Eddy Hary Kusumastuti  
NIM : 011617017337  
Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
Alamat / No. Telp : Bhakti Husada III No. 3 Surabaya / 08155000336

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas namakan saya, serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiatism) dari hasil karya orang lain. Disertasi belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, dan apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh. Karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, 1 Maret 2022

Yang membuat pernyataan,



Eddy Hary Kusumastuti

NIM. 011617017337



## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah rabbil alamin, segala puji kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, atas segala karunia dan ridhaNya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “Perbedaan dan mekanisme respons baik dan buruk pada karsinoma nasofaring terhadap kemoradiasi melalui analisis HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, dan apoptosis pada jaringan biopsi”. Disertasi ini dapat terselesaikan berkat dukungan dan bimbingan dari promotor dan ko-promotor. Perkenankan pada kesempatan ini saya menghaturkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M. Si, sebagai promotor yang penuh kesabaran, perhatian, memberikan bimbingan serta mendorong semangat yang sangat bermanfaat dalam pelaksanaan dan penyelesaian disertasi ini.
2. Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp. THT KL (K), FICS, sebagai ko-promotor yang disela-sela kesibukan beliau telah berkenan meluangkan waktu memberikan bimbingan, arahan dalam penyusunan disertasi ini.
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama pendidikan.
4. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG (K) FER selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp. U (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran periode di awal studi yang telah memberikan kesempatan, dan fasilitas kepada saya selama menempuh pendidikan di Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
5. Dr. Joni Wahyuhadi, dr., Sp. BS (K), selaku Direktur Utama RSUD Dr. Soetomo yang telah memberi kesempatan serta berbagai fasilitas kepada saya dalam menyelesaikan disertasi ini.
6. Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp, OG (K) FER selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M. Sc., Sp. PD-KR selaku Ketua Program Studi periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan.
7. Dr. H. Budi Utomo, dr., M. Kes selaku penguji dan telah berkenan meluangkan waktu memberikan bantuan konsultasi analisis statistik, serta saran dan koreksi untuk kesempurnaan disertasi ini.
8. Prof. Dr. Bambang Suprijanto, dr., Sp. Rad (K) selaku penguji yang telah memberikan arahan dan saran-saran untuk kesempurnaan disertasi ini.
9. Dr. Karyono Mintaroem, dr., Sp. PA selaku penguji yang dengan tulus hati berkenan meluangkan waktu serta memberikan masukan dan arahan untuk kesempurnaan disertasi ini.
10. Dr. Imam Susilo, dr., Sp. PA (K), FISCAM, selaku penguji yang telah memberikan arahan dan saran-saran untuk kesempurnaan disertasi ini.
11. Dr. Gondo Mastutik, drh., M. Kes selaku penguji yang telah memberikan masukan, dorongan semangat serta bantuan dalam pelaksanaan penelitian disertasi ini.

12. Dr. Desak Gede A. Suprabawati, dr., Sp. B (K) Onk selaku penguji, yang telah berkenan memberikan arahan, wawasan dan masukan untuk kesempurnaan disertasi ini.
13. Dr. Dyah Fauziah, Sp. PA (K) selaku Ketua Departemen Patologi Anatomik dan dr. Sjahjenny Mustokoweni, Sp. PA (K), MIAC selaku Ketua Departemen Patologi Anatomik periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan dan motivasi untuk dapat menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
14. Dyah Erawati, dr., Sp. Rad (K) Onk, Anita Widyoningroem, dr., Sp. Rad (K), Triwulan Handarini, dr. Sp. Rad (K) dan Dr. Rosy Setiawati, dr, Sp, Rad (K) yang telah memberikan bantuan kemudahan pengumpulan data sampel penelitian dan memberikan wawasan, arahan dalam penelitian ini.
15. Dr. Anny Setijo Rahaju, dr., Sp. PA (K) dan Priangga Adi Wiratama, dr., Sp. PA, M. H, yang telah memberikan bantuan dan dukungan untuk penyelesaian disertasi ini.
16. Kepada guru-guru saya sejak pendidikan Taman Kanak-Kanak, Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, para dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, khususnya para dosen di Program Studi Spesialis Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., almarhum Prof. Soegeng Soekamto Martoprawiro, dr., MS., Sp. PA (K)., PhD, almarhumah Prof. Dr. Roemwerdiniadi, dr., Sp. PA (K)., Prof. Dr. Juliati H. A., dr., M. S., Sp. PA (K), FIAC., Prof. J. H. Lunardhi., dr., Sp. PA (K), FIAC., Prof. Dr. Endang Joewarini, dr., Sp. PA (K)., almarhum Soedoko Sidohoetomo, dr., Sp. PA (K)., Koesoemowardojo, dr., Msc, Sp. PA (K)., almarhum Suparman, dr., Sp. PA (K)., Faroek Hoesin., dr., Sp. PA (K)., Troef Soemarno., dr., MS., Sp., PA (K)., almarhum Dr. Watadiana, dr., Sp. PA (K)., MS., Tulus Panuwun., dr. MS, Sp. PA (K), almarhumah Eka Kusumowardhani., dr., Sp. PA (K), saya ucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya atas bimbingan dan pengajaran yang diberikan selama masa pendidikan saya. Semoga Allah SWT membalas dengan pahala yang berlipat ganda.
17. Kepada seluruh staf pengajar di Departemen Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Dr. Willy Sandhika, dr., M. Si., Sp. PA (K), Nila Kurniasari., dr., Sp. PA (K), Alphania Rahnayu., dr., Sp. PA (K)., Heriyawati., dr., Sp. PA (K)., Grace Ariani, dr., Sp. PA (K)., Ridholia, dr., Sp. PA (K) terima kasih atas dukungan, doa, bantuan dan kerjasama selama ini.
18. Staf pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan wawasan ilmu yang sangat berharga selama menempuh pendidikan Doktor, semoga Allah SWT melimpahkan pahala berlipat ganda.
19. Seluruh rekan seangkatan mahasiswa Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2016 atas dorongan semangat dan kerjasamanya yang luar biasa untuk menyelesaikan studi.
20. Ika Agustina Kiswari, Amd., SKM., Tamyah Dhita HR, S. Tr. Ak., ibu Lavatini Amd., SKM., dan seluruh teknisi laboratorium beserta karyawan yang telah membantu pelaksanaan proses laboratorium dalam penelitian ini. Semoga Allah SWT melimpahkan pahala berlipat ganda.

21. Kepada saudara-saudaraku tercinta Didik Hary Purwanto, almarhum Hary Prasetyo, Titien Hary Agustantina, drg., M. Kes, Dr. Kurniawan Hary Putranto., ST., MM., yang selalu memberikan doa dan dukungannya kepada saya.
22. Kedua orang tua saya tercinta almarhum ayahanda Drs. A. Haryanto, MM., dan almarhumah ibunda Wulyaningsih yang telah mengasuh dan mendidik dengan penuh kasih sayang. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan pahala berlipat ganda dan memberikan tempat di surga kelak.
23. Kedua mertua tercinta almarhum ayahanda Soedoko Sidohoetomo, dr., Sp. PA (K) dan almarhumah ibunda Prof. Dr. Roemwerdiniadi, dr., Sp. PA (K) yang senantiasa memberikan restu, dukungan dan kasih sayang. Semoga Allah SWT melimpahkan pahala yang berlipat ganda dan memberikan tempat di surga kelak.
24. Suami saya, Ananto Sidohutomo, dr. MARS atas restu, pengertian, kesabaran dan selalu memberikan dorongan semangat, dukungan dan kasih sayang.
25. Serta kepada anak-anak saya terkasih Deanandya, ST. M. Sc, Muhammad Alim Ananto, S. Ked beserta anak menantu Sylvani Kumala Ulinuha, S. Pd, M. Pd., Muhammad Arif Ananto dan Muhammad Ariq Ananto atas kasih sayang, dukungan dan dorongan semangat yang sangat berarti selama proses pendidikan doktor ini.

Surabaya, 1 Maret 2022

Penulis

## RINGKASAN

### **PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS PADA JARINGAN BIOPSI**

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas yang sering dijumpai di wilayah Asia Tenggara, termasuk di Indonesia. Jenis KNF yang tersering adalah *non keratinizing squamous cell carcinoma, undifferentiated sub-type*. Sebagian besar KNF sensitif terhadap kemoradiasi, yang ditandai dengan tidak ada sel tumor pada biopsi sesudah kemoradiasi, tetapi terdapat penderita KNF dengan respons buruk dimana masih didapatkan sel tumor yang *viable* sesudah kemoradiasi. Jalur molekuler yang berperan menimbulkan perbedaan respons kemoradiasi pada KNF hingga saat ini belum diketahui dengan jelas.

Tumor ganas padat sering berada dalam kondisi kekurangan oksigen. Pada kondisi hipoksia, *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), suatu faktor transkripsi pengikat DNA, tidak didegradasi dan berperan mengaktifkan serangkaian gen termasuk promotor *cluster differentiation 133* (CD133), yaitu suatu penanda sel punca kanker, yang mengarah pada penghambatan apoptosis. *Superoxide dismutase* (SOD), suatu *metalloenzyme* yang berperan menurunkan *reactive oxygen species*, dan *heat shock protein 70* (HSP70) suatu pendamping molekuler yang berperan dalam pelipatan protein, keduanya bertindak sebagai pelindung sel terhadap berbagai jejas antara lain terhadap agen radiasi dan kemoterapi. Seluruh biomarker tersebut diduga dapat menghambat apoptosis sel tumor, sehingga sel tumor tetap *survive* dan mempengaruhi respons kemoradiasi.

Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan perbedaan dan mekanisme antara respons baik dan buruk terhadap kemoradiasi pada KNF dengan cara mempelajari perbedaan ekspresi biomarker HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70 dan sel *survive* sebelum dan sesudah kemoradiasi.

Penelitian ini merupakan studi observasional analitik yang dilakukan pada sampel blok parafin jaringan biopsi penderita KNF dengan diagnosis awal *non-keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub type* di Unit Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo periode Januari 2014 – Desember 2019. Jumlah sampel penelitian adalah 34 pasang, sebelum dan sesudah terapi, terdiri dari 18 pasang respons baik dan 16 pasang respons buruk. Sampel jaringan diperoleh dari penderita KNF stadium lanjut yang mendapat terapi radiasi eksternal 70 Gy serta mendapat regimen kemoterapi berupa *platinum based* dan regimen lain. Ekspresi HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD dan HSP70 dievaluasi melalui pewarnaan imunohistokimia, sedangkan sel *survive* dievaluasi berdasarkan sel yang tidak terwarnai dengan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling assay*. Data yang diperoleh dilakukan analisis *bivariate* komparasi untuk menentukan perbedaan antara respons baik dan respons buruk, sebelum dan sesudah kemoradiasi. Analisis menggunakan Uji T 2 sampel bebas bila distribusi data normal dan homogen, apabila data tidak normal menggunakan Uji Mann Whitney.

Hasil data perubahan sebelum dan sesudah kemoradiasi dilakukan analisis jalur menggunakan Smart PLS3.

Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ekspresi HIF-1 $\alpha$  sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,002$ , dan terdapat perbedaan signifikan ekspresi HIF-1 $\alpha$  sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$  sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Mayoritas tumor padat dalam kondisi hipoksia. Sel tumor dalam melawan kondisi hipoksia tersebut dengan cara mendelegasikan kepada HIF1 $\alpha$  untuk mengatur berbagai fungsi dengan tujuan melakukan adaptasi terhadap kondisi hipoksia. Cyclin D1, p21 dan p27 merupakan gen target dari HIF-1 $\alpha$  yang dapat memodifikasi siklus perkembangan sel tumor. *Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  mampu menimbulkan radioresisten sel kanker melalui berbagai cara yaitu melalui jalur metabolisme glukosa, melalui jalur *epithelial-mesenchymal transitional* (EMT), serta pengendalian siklus sel dan autofagi. *Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  mampu mengatur peningkatan protein anti apoptosis yaitu Bcl-XL dan Bcl-2, dan menurunkan protein yang berperan dalam apoptosis yaitu Bak dan Bax, sehingga efek sitotoksik kemoterapi melemah. Akumulasi HIF-1 $\alpha$  mampu meningkatkan gen *proangiogenic* termasuk VEGF, sehingga menghasilkan pembuluh darah yang tidak sempurna. Hal tersebut menyebabkan gangguan aliran obat sehingga menurunkan efek kemoterapi.

Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ekspresi CD133 sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,046$ , terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi CD133 sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$  dan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi CD133 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Literatur menyebutkan bahwa CD133 berkorelasi dengan tingkat diferensiasi, stadium, metastasis jauh, *disease free interval* serta *overall survival* yang buruk pada keganasan berbagai organ. Hal tersebut antara lain karena CD133 dapat mengaktivasi Wnt/  $\beta$  catenin yang selanjutnya berinteraksi dengan faktor transkripsi sehingga mempercepat pertumbuhan sel kanker. CD133 juga mampu mempromosi jalur sinyal PI3K-Akt, sehingga mendorong pertumbuhan sel tumor dan menghambat apoptosis. Paparan radiasi juga dapat meningkatkan *stemness* sel tumor, antara lain akibat radiasi menimbulkan instabilitas gen dan juga mempromosikan jalur EMT.

Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi SOD sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,002$ . Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa SOD sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik lebih tinggi dibandingkan KNF respons buruk. Hal tersebut karena tumor mengalami hipoksia sehingga mengaktifkan HIF-1 $\alpha$  yang mampu menurunkan tingkat c-Myc, sehingga menekan biogenesis mitokondria dan respirasi. Hal tersebut menghalangi produksi ROS, sehingga dihasilkan SOD yang rendah pula. Hasil uji Mann Withney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi SOD sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi SOD sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons

baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,001$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa kemoradiasi berperan menimbulkan kematian sel tumor. Namun pada tumor dengan ekspresi SOD tinggi mampu mengkatalisis dismutase dari superoksida radikal bebas anion menjadi oksigen dan hydrogen peroksida sehingga mencegah kematian sel tumor.

Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi HSP70 sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,046$ . Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi HSP70 sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,001$ , dan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi HSP70 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,001$ . HSP70 merupakan molekul pendamping yang berperan dalam pengaturan pelipatan protein, mampu mencegah degradasi protein dan memastikan tercapainya stabilisasi fungsional berbagai protein di dalam sel yang berada dalam kondisi tertekan, misalnya pada pertumbuhan kanker sehingga dalam penelitian ini ekspresi HSP70 lebih tinggi ditemukan pada KNF respons buruk. HSP70 berperan sebagai protein anti-apoptosis baik pada jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik.

Hasil uji Mann Whitney dalam penelitian ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan persentase sel tumor yang *survive* sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,088$ . Hal itu karena kedua kelompok tersebut belum mendapat induksi radiasi maupun kemoterapi. Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan persentase sel tumor yang *survive* sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,001$ , serta terdapat perbedaan yang signifikan perubahan persentase sel tumor yang *survive* sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p= 0,001$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa pada KNF respons baik, pemberian kemoradiasi bermanfaat menimbulkan kematian sel tumor. Sedangkan pada KNF respons buruk yang bersifat progresif, sering mengandung sel tumor dengan mutasi p53, sehingga kehilangan fungsi sebagai gen penekan tumor. Hal tersebut mengarah pada kelangsungan hidup sel tumor, hambatan apoptosis dan menimbulkan respons kemoradiasi yang buruk.

Hasil analisis jalur menunjukkan bahwa terdapat pengaruh signifikan HIF-1 $\alpha$  terhadap CD133 dengan  $p= 0,001$ , namun tidak terdapat pengaruh signifikan CD133 terhadap sel *survive* dengan  $p= 0,972$ . Hal tersebut karena modulasi CD133 dipengaruhi oleh kondisi hipoksia dan disfungsi mitokondria. Hipoksia menyebabkan aktivasi promotor CD133 oleh HIF-1 $\alpha$ . Aktivitas CD133 tergantung pada aktivasi dari promotor-promotornya, antara lain oleh OCT4, SOX2 dan Notch1, selain oleh HIF- $\alpha$ -1. Aktivasi CD133 juga dipengaruhi oleh fosforilasi *tyrosine 828* pada *c terminal domain*. Terdapat pengaruh signifikan SOD dan HSP70 terhadap sel *survive* dengan  $p= 0,047$  dan  $p= 0,001$ , serta terdapat pengaruh signifikan sel *survive* terhadap respons kemoradiasi dengan  $p= 0,001$ .

Penelitian ini menjelaskan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70 dan sel *survive* sebelum dan sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk. Mekanisme respons kemoradiasi pada KNF ditentukan oleh jalur SOD, HSP70 dan sel *survive*, dimana pada respons buruk terjadi peningkatan HSP70, SOD dan sel *survive*.

## ***SUMMARY***

### **THE DIFFERENCES AND MECHANISMS OF GOOD AND POOR CHEMORADIATION RESPONSES OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA THROUGH ANALYSIS OF HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, AND APOPTOSIS IN TISSUE BIOPSIES**

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a common malignant tumor found in Southeast Asia, including Indonesia. Non keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub-type, however, is more commonly encountered in Dr. Soetomo Hospital. Although the majority of NPC are sensitive to chemoradiation, characterized by the absence of tumor cells on follow-up biopsies, there is a significant poor response that is still present in viable tumor cells after chemoradiation. Unfortunately, the molecular pathway that causes differences in the chemoradiation response in NPC is not yet clearly understood.

Oxygen deprivation is common in malignant solid tumors. Under hypoxia, hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), DNA binding transcription factors are undegraded and act as an activator to a series of genes including promoter of cluster differentiation 133 (CD133), a cancer stem cells marker which leads to inhibition of apoptosis. Superoxide dismutase (SOD), a metalloenzyme that plays a role in reducing reactive oxygen species, and heat shock protein 70 (HSP70), a molecular chaperone that plays a role in protein folding, both of which act as cytoprotector against various types of injury, including radiation and chemotherapy agents. All of these biomarkers are thought to be able to inhibit apoptosis, leading cells to survive and they also affect the chemoradiation response.

The study aims is to elucidate the differences and mechanism of good and poor chemoradiation responses of NPC by studying the differences in the expressions of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival before and after chemoradiation.

This research is an analytic observational study conducted on formalin-fixed paraffin embedded archives of tissue biopsy of NPC patients with an initial diagnosis of non-keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub-type in the Anatomical Pathology Unit of Dr. Soetomo General Hospital period January 2014 – December 2019. Samples are 34 pairs of pre and post-chemoradiation, composed of 18 pairs of good responses and 16 pairs of poor responses. Tissue samples were obtained from patients who received 70 Gy external radiation and combined platinum-based chemotherapy. Immunohistochemistry stain was performed to evaluate expressions of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, and HSP70, while cell survivals were evaluated by TUNEL assay. The data were tested by comparative bivariate analysis to determine the difference between good and poor responses, before and after chemoradiation. Analysis using t-test 2-sample was chosen if the data distribution was normal and homogeneous. If the data had non-normal distribution, analysis using the Mann Whitney Test was chosen. The results of delta before and after chemoradiation data were carried out by path analysis using Smart PLS3.

Mann Whitney result showed that there were significant differences in expressions of HIF-1 $\alpha$  before chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,002$ ), after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ), delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ). The majority of solid tumors are hypoxic. Tumor cells fight hypoxic conditions by delegating to HIF1 $\alpha$  to regulate various functions to adapt to hypoxic conditions. HIF 1 is a transcription factor that induces a series of genes. Cyclin D1, p21, and p27 are the target genes of HIF-1 $\alpha$  that can modify the cell cycle of tumor growth. HIF-1 $\alpha$  is able to cause radioresistance through various ways including through glucose metabolism pathways, the epithelial-mesenchymal transitional pathway, as well as cell cycle control and autophagy. HIF-1 $\alpha$  is able to regulate the increase in anti-apoptotic proteins such as Bcl-XL and Bcl-2, and decrease proteins that play a role in apoptosis such as Bak and Bax, thereby weakening the cytotoxic effect of chemotherapy. HIF-1 $\alpha$  was able to upregulate the increase in anti-apoptotic proteins such as Bcl-XL and Bcl-2, and block proteins that play a role in apoptosis such as Bak and Bax, leading to a weakened cytotoxic effect of chemotherapy. HIF-1 $\alpha$  accumulation is able to increase proangiogenic genes including VEGF, resulting in imperfect blood vessels. This causes disruption of drug flow thereby reducing the effect of chemotherapy.

The result of Mann Withney tests showed there were significant differences in expression of CD133 before chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,046$ ), after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ), delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ). The literature states that CD133 is correlated with the level of differentiation, stage, distant metastases, disease free interval, and poor overall survival in malignancies of various organs. This is because CD133 can activate Wnt/ $\beta$  catenin which then interacts with transcription factors thereby accelerating the growth of cancer cells. CD133 is capable of promoting the PI3K-Akt signaling pathway, leading to promote tumor cell growth and inhibit apoptosis. Radiation exposure can also increase tumor cell stemness, through radiation causing gene instability and promoting the EMT pathway

The result of t-test 2 sample showed that there were significant differences in expression of SOD before chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,002$ ). The results of this study showed that the SOD before chemoradiation in NPC good response was higher than in NPC poor response. This is because the tumor is hypoxic, so it activates HIF-1 $\alpha$  which can reduce c-Myc levels, thereby suppressing mitochondrial biogenesis and respiration. This prevents the production of ROS, resulting in low SOD as well. The result of Mann Whitney tests showed that there were significant differences in expression of SOD after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ) and delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ). This indicates that chemoradiation plays a role in causing tumor cell death. However, tumors with high SOD expression were able to catalyze the dismutase of superoxide anion free radicals into oxygen and hydrogen peroxidase, thereby preventing tumor cell death.

The result of t-tests 2-sample showed that there were significant differences in expression of HSP70 before chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,044$ ), after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ), delta before and



after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ). HSP70, a chaperone molecule that plays a role in regulating protein folding, is able to prevent protein degradation and ensure the achievement of functional stabilization of various proteins in cells under stress conditions, for example in cancer growth. HSP70 acts as an anti-apoptotic protein in both the intrinsic and extrinsic pathways.

The result of Mann Whitney tests showed that there was no significant difference of apoptosis which was evaluated from cell tumor survival before chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,088$ ). This was because the two groups had not received radiation induction or chemotherapy. But there were significant differences after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ), and delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p= 0,001$ ). This shows that chemoradiation is beneficial in causing tumor cell death, resulting in a good NPC response. Whereas in NPC poor response, a progressive tumor, is often containing tumor cells with p53 mutations, thus they lose their function as tumor suppressor genes. This leads to tumor cell survival, inhibits apoptosis, and causes a poor response.

The result of path analysis showed that there was a significant effect of HIF-1 $\alpha$  on CD133 ( $p= 0,001$ ), but there was no significant effect of CD133 on apoptosis ( $p= 0,972$ ). This is because CD133 modulation is influenced by hypoxia and mitochondrial dysfunction. Hypoxia leads to activation of the CD133 promoter by HIF-1 $\alpha$ . CD133 activity depends on the activation of its promoters, namely OCT4, SOX2 Notch1, in addition to HIF- $\alpha$ -1. CD133 activation is also affected by phosphorylation of tyrosine 828 in the c-terminal domain. There were significant effects of SOD and HSP70 on cell survival ( $p= 0,047$  and  $p= 0,001$ ), and there was a significant effect of cell survival on chemoradiation responses ( $p= 0,001$ ).

In this study, it was proven that there were significant differences in expressions among HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival delta before and after chemoradiation in good and poor responses of NPC. The mechanisms of chemoradiation responses in NPC are determined by SOD, HSP70, and cell survival, which in poor responses showed increases in expressions of SOD, HSP70, and cell survival.

## **ABSTRACT**

### **THE DIFFERENCES AND MECHANISMS OF GOOD AND POOR CHEMORADIATION RESPONSES OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA THROUGH ANALYSIS OF HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, AND APOPTOSIS IN TISSUE BIOPSIES**

**Background:** Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is commonly sensitive to chemoradiation, but it has a significant poor response. In addition, the molecular pathway in the chemoradiation responses in NPC is not yet clearly understood.

**Objective:** To elucidate the differences and mechanism of good and poor chemoradiation responses of NPC by studying the expression of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival.

**Methods:** This study was conducted on FFPE tissue biopsy of non-keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub-type of NPC patients in Dr. Soetomo Hospital period 2014 – 2019. Samples are 34 pairs of pre and post-chemoradiation, composed of 18 pairs of good and 16 pairs of poor responses. All patients received 70 Gy external radiation and combined platinum-based chemotherapy. Immunohistochemistry was performed to evaluate HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD and HSP70, while cell survivals were evaluated by TUNEL assay. The data were tested by comparative bivariate and path analysis.

**Result:** There were significant differences in the delta expression of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival before and after chemotherapy in good and poor responses, each of which has a p-value of 0,001. There was a significant effect of HIF-1 $\alpha$  on CD133 (p-value 0,001), but no of CD133 on cell survival (p-value 0,972). There were significant effects of SOD and HSP70 on cell survival (p-value of 0,047 and 0,001), and of cell survival on chemoradiation response (p-value of 0,001).

**Conclusion:** There were significant differences in the delta expressions among HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival in good and poor chemoradiation responses of NPC. The mechanisms of chemoradiation responses in NPC are determined by SOD, HSP70, and cell survival, in which poor response showed increased expressions of SOD, HSP70, and cell survival.

**Keyword:** Nasopharyngeal carcinoma, chemoradiation, and chemoradiation response.



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131  
Telp. (031) 5020251, 5030252, 5030253 Faks. 5022472  
website : <http://www.doktor.fk.unair.ac.id>, email : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

Nomor : 754/UN3.1.1/DL/2021

28 Januari 2021

Lamp :

Hal : Penyanggah Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Kepada Yth.

Pimpinan Sidang Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor FK UNAIR

Surabaya

Sehubungan dengan Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka) sdr. **Isnin Anang Marhana, dr., SpP(K)** pada tanggal **2 Februari 2021**, maka dengan ini kami sampaikan nama-nama penyanggah ujian akhir yang bersangkutan untuk diketahui.

Pimpinan sidang ujian akhir terbuka: Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG(K)

Para penyanggah dimaksud adalah :

1. Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., Sp.P(K) \*
2. Dr. Gondo Mastutik, drh., M Kes \*\*)
3. Prof. Win Darmanto, Drs., M.Si., Ph.D
4. Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si
5. Muhammad Miftahussurur, dr, Sp.PD., M.Kes., Ph.D., FINASIM
6. Dr. Anggraini Dwi Sensusiati, dr., Sp.Rad(K)
7. Dr. Hanik Badriyah Hidayati, dr., Sp.S(K)
8. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr., Sp.KK(K), FINS-DV., FAADV
9. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., Sp.Par(K)
10. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp OG(K)

Demikian dan atas perhatiannya disampaikan terima kasih.

a.n.Dekan  
Wakil Dekan I.

Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS  
NIP. 197609022008011009

Catatan :

- \*) Promotor
- \*\*\*) Ko-Promotor I
- \*\*\*) Ko-Promotor II

Diterbitkan untuk Ujian Akhir Tahap II (Terbuka)

## **DISERTASI**

**PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KANKER PARU  
JENIS *NON SMALL CELL LUNG CANCER*  
MENGUNAKAN EKSPRESI MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN  
A1, A3, A1 DAN A3, SERTA A1-A6**



**ISNIN ANANG MARHANA**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KANKER PARU  
JENIS *NON SMALL CELL LUNG CANCER*  
MENGUNAKAN EKSPRESI MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN  
A1, A3, A1 DAN A3 SERTA A1-A6**

**DISERTASI  
Untuk memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**ISNIN ANANG MARHANA**

**011417017344**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

iii

**LEMBAR PENGESAHAN**

**DISERTASI**

**PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KANKER PARU  
JENIS *NON SMALL CELL LUNG CANCER*  
MENGUNAKAN EKSPRESI MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN  
A1, A3, A1 DAN A3 SERTA A1-A6**

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 4 JANUARI 2021

Oleh

Promotor



Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., Sp.P(K)  
NIP. 194708101974121002

Kopromotor



Dr. Gondo Mastutik drh., M.Kes  
NIP. 197306272002122001

Mengetahui  
KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor



Prof. Dr. H. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K)  
NIP. 196108172016016101

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai  
oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)  
pada Tanggal 4 Januari 2021**

Panitia penguji :

- Ketua : 1. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., Sp.Par(K)  
Anggota : 2. Prof. Dr. H.Muhammad Amin,dr.,Sp.P(K)  
3. Dr. Gondo Mastutik drh., M.Kes  
4. Prof. Dr.I Ketut Sudiana, Drs., M. Si  
5. Prof. Dr. Jusak Nugraha,dr.,MS.,Sp.P(K)  
6. Dr. Irawati Djaharuddin, dr., SpP(K)  
7. Dr. Windhu Purnomo, dr.,MS.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama kami panjatkan puji syukur ke hadirat Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunianya sehingga karya akhir dengan judul “**Pengembangan Diagnosis Kanker Paru Jenis *Non Small Cell Lung Cancer* Menggunakan Ekspresi Melanoma Associated Antigen A1, A3, A1 dan A3 serta A1-A6**” dapat diselesaikan. Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kami ucapkan kepada:

1. Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P(K), Promotor disertasi saya yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, *support* dan saran di tengah kesibukan beliau.
2. Dr. Gondo Mastutik, drh., M. Kes, selaku Ko-Promotor disertasi, yang dalam kesibukannya masih berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, memberi petunjuk dan dorongan yang sangat besar untuk dapat menyelesaikan disertasi saya ini.
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., CMA, Rektor UNAIR yang telah memberikan kami kesempatan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
4. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K) Dekan FK UNAIR, dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Sc., Sp.PD., K-EMD, FINASIM Dekan FK Unair periode 2010-2015 dan Prof. Dr. Soetojo, dr., SP.U(K) Dekan FK Unair periode 2015-2020 yang telah memberikan kami kesempatan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
5. Prof. Dr. H. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K), Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M.Sc, Sp.PD, K-R, FINASIM selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode 2015-2020



yang telah memberikan kami bimbingannya mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

6. Dr. Joni Wahyuhadi, dr., Sp.BS (K), Direktur Utama RSUD Dr. Soetomo, dan dr. H. Harsono Direktur Utama RSUD Dr. Soetomo pada periode sebelumnya, yang telah memberikan kami kesempatan untuk belajar di Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
7. Winariani Kosoemoprodjo, dr., SpP(K), MARS, Ketua Departemen/ SMF Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi periode 2011-2019 dan Helmia Hasan, dr. Sp.P(K), M.Pd.Ked Ketua Departemen/ SMF Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi periode 2019-2020 yang telah mengizinkan saya untuk mengikuti pendidikan Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
8. Pembimbing dan Penguji kami, Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., Sp.Par(K), Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K), Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.Si, Dr. Daniel Maranatha, dr., Sp.P(K), Dr. Windhu Purnomo, dr.,MS, Dr. Susanthi Djajalaksana, dr., Sp.P(K) dan Dr. Irawati Djaharuddin, dr., Sp.P(K) yang dalam kesibukannya senantiasa mau meluangkan waktunya untuk membimbing dan memberikan petunjuk.
9. Para dosen di Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang senantiasa menginspirasi dan menambah wawasan keilmuan saya.
10. Isnu Pradjoko, dr., Sp.P(K), senior dan mentor saya dibidang Intervensi Paru atas segala dedikasi, support dan perhatiannya selama ini.
11. Segenap Staf Paru: Dr. Soedarsono, dr., Sp.P(K), Dr. Resti Yudhawati, dr., Sp.P(K), Tutik Kusmiati, dr., Sp.P(K), Arief Bakhtiar, dr., Sp.P(K), Prastuti Asta W., dr., Sp.P, Wiwin Is Effendi, dr., Sp.P(K), PhD, Anna Febriani, dr., Sp.P(K), Ariani Permatasari, dr., Sp.P(K), Irmu Syafa'ah, dr., Sp.P(K), Farah Fatmawati, dr., Sp.P(K), Alfian Nur Rosyid, dr., Sp.P(K), Wahyu Dwi, dr., Sp.P dan Herley Windo Setiawan, dr., Sp.P yang telah

menemani hari-hari saya mengabdikan di Departemen/ KSM Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FK Unair/ RSUD dr. Soetomo Surabaya.

12. Atika S.Si, M.Kes, pembimbing statistik yang telah sabar membimbing kami dalam menyelesaikan karya akhir ini.
13. Ayah Soleh (alm) dan ibu Soedjarwati (alm), yang telah memberikan kasih sayang dan cinta kasih yang tulus. Terimakasih atas dukungan dan doa yang tak pernah putus demi keberhasilan kami dalam menyelesaikan pendidikan Doktor ini.
14. Bapak dan ibu mertua, Adam Subakti dan Dwi Sasi yang selalu memberikan doa restu dan dukungan kepada saya selama menempuh pendidikan Doktor ini.
15. Istri tercinta dr. Olivia Mahardani Adam, SpS dan anak-anak tercinta Radinka Azzahra Iviaputri, Nadhira Aurelia Iviaputri dan Janitra Alana Iviaputri yang senantiasa sabar dan selalu memberikan cinta, kasih sayang, semangat, dukungan dan doa dalam menempuh pendidikan doktor ini.
16. Kakak dan keluarga, Ika Elvie Yulinsyah, S.K.M, Agung Mulyo Widodo, ST, M.Sc, Yanathifal Salsabila Anggraeni dan Sabrina Azalia Sekar Anggraeni.
17. Saudara dari istri dan keluarga, Yessi Adam Connery, S.E, Indra Ranu Kusuma, S.T, MSc, Ratu Balqis Fernando, Ratu Neffertiti Fernando, Muhammad Nur Prayoga, Naailah Kusuma Rahayu, Shafia Nuura Aida, Sofia Viona Adam, A.Md, Sugianto, Sharren Elvaretta P.F, Keefano Fharzana A.F, Kyreinara Adreena T.F. Sheilla Marissa Adam, A.Md, Hisbullah Huda A.Md, Kennard Arjuna Huda Zabdan, Keyra Hanum Azqaneeta Huda.
18. Segenap staf administrasi dan tenaga pendidikan di lingkungan Departemen/ KSM Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FK UNAIR dan RSUD dr. Soetomo, khususnya di Ruang Tindakan Paru Gedung Diagnostik Center Lantai 6, terimakasih atas bantuan dan kerjasamanya selama kami menempuh pendidikan dokter spesialis.

19. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh kami, yang telah membantu selama pendidikan dan penyusunan karya akhir ini.

Akhir kata dengan segala kerendahan hati, semoga disertasi ini memberikan manfaat bagi penulis dan bagi dunia pendidikan khususnya bidang Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi. Terimakasih.

Surabaya, 2 Februari 2021

Penulis

## RINGKASAN

### **PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KANKER PARU JENIS *NON SMALL CELL LUNG CANCER* MENGUNAKAN EKSPRESI MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN A1, A3, A1 DAN A3 SERTA A1-A6**

Kanker paru memiliki angka harapan hidup 5 tahun yang paling rendah dari seluruh jenis kanker yaitu di bawah 18%. Lebih dari dua pertiga kanker paru baru dapat didiagnosis saat kanker paru dalam stadium lanjut yang sudah memiliki angka harapan hidup yang rendah, sehingga perlu diupayakan pengembangan diagnostik kanker paru, terutama yang dapat mendiagnosis pada stadium dini. *Melanoma-associated antigen* (MAGE) diketahui berperan pada proses onkogenesis dan penghambatan apoptosis dengan cara memblok siklus kaspase. Ekspresi gen MAGE I dideteksi pada beberapa tumor, misalkan kanker paru. mRNA MAGE RT PCR menunjukkan hasil yang menjanjikan untuk deteksi dini kanker paru. Namun masih perlu diteliti lebih lanjut bagaimana sensitifitasnya bila dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional sitologi dan histopatologi. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil perbandingan mRNA MAGE A1, A3, A1 dan A3 serta A1-A6 dengan hasil histopatologi dan sitopatologi pada tumor paru NSCLC.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik yang dilakukan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya pada Februari 2017-September 2019. Sampel penelitian adalah spesimen biopsi penderita kanker paru yang memenuhi kriteria inklusi untuk menjalani tindakan *core biopsy*, BAL, dan *forceps biopsy* yaitu sebanyak 100 pasien (31 *core biopsy*, 37 BAL dan 33 *forceps biopsy*). Data diperoleh dari rekam medis Ruang Tindakan Paru dan Poli Onkologi di RSUD Dr Soetomo. Data demografi dan karakteristik subjek dianalisis secara deskriptif Analisis data menggunakan uji Statistik tabel 2x1 (*Chi Square*), uji McNemar dan uji Kappa. Spesimen kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan *sequencing* menggunakan *Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)*.

Hasil histopatologi menunjukkan mayoritas adenocarcinoma (31.6%). MAGE apabila dibandingkan dengan hasil histopatologi didapatkan tidak terdapat perbedaan bermakna hasil MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 dan A3 serta MAGE A1-A6 pada jaringan sentral ( $p > 0,05$ ). Hasil Uji Kappa pada jaringan sentral menunjukkan terdapat kesesuaian yang bermakna antara gen MAGE A1 (rendah), gen MAGE A3 (cukup), gen MAGE A1 dan A3 (rendah) dan MAGE A1-6 (cukup), serta pada data jaringan sentral tidak terdapat perbedaan bermakna dengan hasil histopatologi dengan hasil Uji Kappa menunjukkan terdapat kesesuaian yang bermakna ( $p < 0,05$ ), dengan tingkat kesesuaian cukup. Sensitifitas dan spesifitas tertinggi didapat pada ekspresi mRNA MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 and A3 and MAGE A1-6 pada lesi sentral, dengan ekspresi 35,7, sensitifitas 78,6, spesifitas 75,0, Mc Nemar tes didapat kesesuaian yang baik dengan pemeriksaan HPA.

Hasil *sequencing* dikerjakan pada semua spesimen, namun karena ukuran dan jumlah spesimen yang relatif kecil, yang dapat dibaca dengan baik adalah 8 pasien, kemudian dibandingkan dengan dua data pada Genbank menunjukkan adanya 6 mutasi pada data genBank dengan accession number NM004988.5, yaitu pada spesimen dengan kode FB-21 A1, FB-53 A1, BP-5 A1, BP-58 A1, CB-38 A1, CB-87 A1 dan 3 mutasi pada genBank dengan accession number AY148486. 1 pada spesimen dengan kode FB 48 A1, BP 39-A1 dan FB-53 A1. Pada pemeriksaan *sequencing*, didapatkan 6 mutasi genetik pada MAGE A1, 4 pada lesi sentral dan 2 dari lesi perifer.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Pemeriksaan biologi molekular dengan menggunakan tumor antigen mRNA MAGE A1, mRNA MAGE A3, mRNA MAGE A1 dan A3 serta mRNA MAGE A1-A6 dapat dijadikan alternatif untuk pengembangan diagnosis kanker paru.

## SUMMARY

### DEVELOPMENT OF LUNG CANCER DIAGNOSIS OF NON SMALL CELL LUNG CANCER USING THE EXPRESSION OF MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN A1, A3, A1 DAN A3, AND A1-6

Lung cancer has the lowest 5 year life expectancy of all types of cancer, which is under 18%. More than two-thirds of lung cancer can only be diagnosed when lung cancer is in an advanced stage which already has a low life expectancy, so it is necessary to develop lung cancer diagnostics, especially those that can diagnose at an early stage. Melanoma-associated antigen (MAGE) is known to play a role in oncogenesis and inhibition of apoptosis by blocking the caspase cycle. MAGE I gene expression was detected in several tumors, for example the lung cancer mRNA MAGE RT PCR showed promising results for early detection of lung cancer. However, it still needs to be further investigated how sensitive it is when compared to conventional cytology and histopathology examinations. Therefore, this study aims to determine the comparison of the mRNA MAGE A1, A3, A1 and A3 as well as A1-A6 with the histopathological and cytopathological results of NSCLC lung tumors.

This research was an analytic observational study conducted at RSUD Dr. Soetomo Surabaya in August-September 2019. The research sample was a biopsy specimen of lung cancer patients who fulfilled the inclusion criteria to undergo core biopsy, BAL, and forceps biopsy, namely 100 patients (31 core biopsy, 37 BAL and 33 forceps biopsy). The data were obtained from the medical records of Pulmonology Interventional Room and Oncology Clinic at Dr Soetomo Hospital. Data analysis used the 2x1 table statistical test (Chi Square), McNemar test and Kappa test using SPSS For Mac Version 20.00. The specimen was then followed by sequencing examination) using a Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Based on the histopathological results, the majority were adenocarcinoma (31,6%). The results of the Kappa test on central lesion showed significant conformity between MAGE A1 (low), MAGE A3 (sufficient), MAGE A1 and A3 (Low) and MAGE A1-6 (sufficient). When compared with the histopathological results, MAGE showed no significant differences in the results of MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 and A3 and MAGE A1-A6 in the central lesions ( $p > 0.05$ ). The results of the Kappa test on the central lesions showed a significant conformity between the MAGE A1 gene (low), the MAGE A3 gene (sufficient), the MAGE A1 and A3 genes (low) and MAGE A1-6 (sufficient), and in the central lesions there was no significant difference with the histopathological results with the Kappa test results showing a significant agreement ( $p < 0.05$ ), with a sufficient level of conformity. The highest sensitivity and specificity were obtained in the expression of mRNA MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 and A3 and MAGE A1-6 in central lesions, with an expression of 35.7, sensitivity 78.6, specificity 75.0, Mc Nemar test obtained a good fit with the HPA examination.

The sequencing results were carried out on all specimens, but due to the relatively small size and number of specimens, 8 patients were able to read well, then compared with the two data on Genbank, it showed that there were 6 mutations in genBank data with accession number NM004988.5, namely in specimens. with codes FB-21 A1, FB-53 A1, BP-5 A1, BP-58 A1, CB-38 A1, CB-87 A1 and 3 mutations in genBank with the accession number AY148486. 1 on specimens coded FB 48 A1, BP 39-A1 and FB-53 A1. On sequencing studies, 6 genetic mutations were found in MAGE A1, 4 in central lesions and 2 in peripheral lesions.

From this study it can be concluded that molecular biology examination using tumor antimRNA MAGE A1, MAGE A3 gene, MAGE A1 and A3 genes and MAGE A1-A6 genes can be used as an alternative for developing lung cancer diagnosis.

## ABSTRAK

### PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KANKER PARU JENIS *NON SMALL CELL LUNG CANCER* MENGUNAKAN EKSPRESI MELANOMA ASSOCIATED ANTIGEN A1, A3, A1 DAN A3 SERTA A1-A6

#### Latar Belakang

*Melanoma-associated antigen* (MAGE) adalah salah satu tumor antigen yang diketahui berperan pada proses onkogenesis dan penghambatan apoptosis. Sebagai pengembangan diagnosis kanker paru, MAGE perlu diteliti lebih lanjut bila dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional sitologi dan histopatologi.

#### Metode

Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik yang dilakukan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya pada Februari 2017-September 2019. Sampel penelitian adalah spesimen biopsi penderita kanker paru meliputi 31 *core biopsy*, 37 BAL, dan 33 *forceps biopsy*.

#### Hasil

Hasil histopatologi menunjukkan mayoritas adenocarcinoma (31.6%). MAGE apabila dibandingkan dengan hasil histopatologi didapatkan tidak terdapat perbedaan bermakna hasil MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 dan A3 serta MAGE A1-A6 pada jaringan sentral ( $p > 0,05$ ). Hasil Uji Kappa pada jaringan sentral menunjukkan terdapat kesesuaian yang bermakna antara gen MAGE A1 (rendah), gen MAGE A3 (cukup), gen MAGE A1 dan A3 (rendah) dan MAGE A1-6 (cukup), serta pada data jaringan sentral tidak terdapat perbedaan bermakna dengan hasil histopatologi dengan hasil Uji Kappa menunjukkan terdapat kesesuaian yang bermakna ( $p < 0,05$ ), dengan tingkat kesesuaian cukup. Sensitivitas dan spesifitas tertinggi didapat pada ekspresi mRNA MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 and A3 and MAGE A1-6 pada lesi sentral, dengan ekspresi 35,7, sensitivitas 78,6, spesifisitas 75,0, Mc Nemar tes didapat kesesuaian yang baik dengan pemeriksaan HPA. Pada pemeriksaan sequencing, didapatkan 6 mutasi genetik pada MAGE A1, 4 pada lesi sentral dan 2 dari lesi perifer.

#### Kesimpulan

Pemeriksaan biologi molekular dengan menggunakan tumor antigen MAGE A1, MAGE A3, MAGE A1 dan A3 serta MAGE A1-A6 dapat dijadikan alternatif untuk pengembangan diagnosis kanker paru, khususnya kanker paru dengan lokasi di sentral.

Kata Kunci: Melanoma Antigen, *non small cell lung cancer*, biologi molekuler





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131  
Telp. (031) 5020251, 5030252, 5030253 Faks. 5022472  
website : <http://www.doktor.fk.unair.ac.id> email : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

Nomor : 2152/UN3.1.1/DL/2021

Lamp

19 April 2021

Hal : Penyanggah Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

Kepada Yth.  
Pimpinan Sidang Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)  
Program Studi Ilmu Kedokteran Jengjang Doktor FK UNAIR  
Surabaya

Sehubungan dengan Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka) sdr. **AA Muhammad Nur Kasman, S.Si., M.Kes** pada tanggal **22 April 2021**, maka dengan ini kami sampaikan nama-nama penyanggah ujian akhir yang bersangkutan untuk diketahui.

Pimpinan sidang ujian akhir terbuka: Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS

Para penyanggah dimaksud adalah :

1. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG(K) \*) ✓
2. Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si \*\*) ✓
3. Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D ✓
4. Dr. Dwi Aprilawati, dr., M.Kes., Sp.GK ✓
5. Dr. Afif Nurul Hidayati, dr., Sp.KK(K), FINS-DV., FAADV ✓
6. Dr. Tatik Hernawati, Drh., M.Si ✓
7. Dr. Erma Safitri, M.Si., Drh ✓
8. Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes ✓
9. Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS ✓

Demikian dan atas perhatiannya disampaikan terima kasih



Dr. Achmad C. Romdhoni, dr., Sp.THT-KL(K), FICS  
NIP. 197609022008011009 ✓

Catatan :

- \*) Promotor
- \*\*) Ko-Promotor I
- \*\*\*) Ko-Promotor II

**DISERTASI**

**MEKANISME KERUSAKAN MIKROTUBULUS MELALUI  
PERUBAHAN PROTEIN JALUR *MATURATION PROMOTING FACTOR*  
(MPF) DAN *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE* (MAPK)  
PADA MATURASI OOSIT *IN VITRO* PASCA VITRIFIKASI**



**AA MUHAMMAD NUR KASMAN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**MEKANISME KERUSAKAN MIKROTUBULUS MELALUI  
PERUBAHAN PROTEIN JALUR *MATURATION PROMOTING FACTOR*  
(MPF) DAN *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE* (MAPK)  
PADA MATURASI OOSIT *IN VITRO* PASCA VITRIFIKASI**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
telah dipertahankan di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada hari : Kamis  
Tanggal : 22 April 2021  
Pukul : 10.00 – 12.00 WIB**

**Oleh :**

**AA MUHAMMAD NUR KASMAN  
011617017343**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**MEKANISME KERUSAKAN MIKROTUBULUS MELALUI  
PERUBAHAN PROTEIN JALUR *MATURATION PROMOTING FACTOR*  
(MPF) DAN *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE* (MAPK)  
PADA MATURASI OOSIT *IN VITRO* PASCA VITRIFIKASI**


TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 27 April 2021

Oleh  
Promotor



Prof. Dr. Budi Santoso, dr.Sp. OG (K)  
NIP. 196302171989111001

Kopromotor



Prof. Dr. Widjiati, drh. M.Si  
NIP. 196209151990022001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai  
Oleh panitia penguji Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)  
pada Tanggal 17 Maret 2021**

**Panitia Penguji**

Ketua : Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes  
Anggota : 1. Prof. Dr. Budi Santoso, dr.Sp.OG (K)  
2. Prof. Dr. Widjiati, drh, M.Si  
3. Prof. Ir. Mochammad Sasmito Djati, M.Si  
4. Aucky Hinting, dr., Ph.D., Sp.And  
5. Dr. Ni Wajan Tirthaningsih, dr., MS., PA(K)  
6. Dr. Reny I'tishom, M.Si  
7. Dr. Sri Ratna Dwiningsih, dr., Sp.OG (K)

Ditetapkan dengan surat keputusan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Tentang Panitia Penguji Disertasi  
Nomor : 127/UN3.1.1/HK/2021  
Tanggal : 10 Maret 2021

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Tidak lupa shalawat serta salam saya sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW.

Dengan segala kerendahan hati, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang tulus kepada yang terhormat : Prof. Dr. Budi Santoso, dr.Sp.OG (K), sebagai promotor, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dukungan dan semangat serta berkesempatan meluangkan waktu untuk membimbing demi perbaikan disertasi ini. Prof. Dr. Widjiati, drh., MSi, sebagai ko-promotor, yang telah membimbing dan memberi dorongan serta semangat yang sangat bermanfaat bagi pelaksanaan penelitian dan peningkatan mutu disertasi.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan Republik Indonesia, atas segala bantuan dana selama menempuh pendidikan.

Dengan terselesainya disertasi ini, perkenankanlah saya juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT.Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga beserta seluruh jajarannya, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Budi Santoso, dr.Sp.OG (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode saat ini beserta seluruh jajarannya, dan Prof. Dr. Soetojo, dr.Sp.U (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga periode sebelumnya beserta seluruh jajarannya, atas kesempatan yang diberikan

kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor di Universitas Airlangga.

3. Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr. Sp.OG(K), selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor periode saat ini beserta seluruh jajarannya, dan Prof. Joewono Soeroso, dr. Sp.PD-KR. M.Sc, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor periode sebelumnya beserta seluruh jajarannya, yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk menyelesaikan disertasi.
4. Dr. H. Budi Utomo, dr. M.Kes, Aucky Hinting, dr., Ph.D., Sp.And, Dr. Ni Wajan Tirthaningsih, dr., MS., PA(K), Dr. Reny I'tishom, Dr. Sri Ratna Dwiningsih, dr., Sp.OG (K), dan Prof. Mochammad Sasmito Djati, sebagai Tim Penguji disertasi, yang telah memberikan kritik dan masukan terbaik demi kesempurnaan disertasi.
5. Pimpinan beserta Staf Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Lembaga Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya, atas segala dukungan dan kerjasamanya selama pelaksanaan penelitian.
6. Seluruh staf pengajar di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang sangat berharga dan bermanfaat selama proses perkuliahan.
7. Seluruh staf di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas segala bantuan selama menempuh pendidikan.
8. Seluruh rekan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah bekerja sama untuk menyelesaikan pendidikan.

9. Orang tua saya, ayahanda Drs. H. Ahmad dan ibunda H. Itam yang telah mengasuh, mendidik, memberi nasehat yang baik dengan penuh kasih sayang, serta mendoakan yang terbaik sampai saat ini.
10. Saudara kandung saya H. AA Nurhasniyanti, S.Pd, Nurarfian Naufan, SE, Ibnu Shina, ST, dan Masyitah Aulia, MT, yang tetap selalu berkomunikasi dan memberikan semangat agar sukses menjalani proses pendidikan.
11. Semua pihak yang telah memotivasi, mendukung, dan membantu sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Semoga disertasi ini dapat berkontribusi bagi perkembangan dan kemajuan teknologi di bidang ilmu kedokteran pada khususnya. Semoga Allah SWT tetap selalu melimpahkan segala nikmat-Nya kepada kita semua. Amin.

Penulis

AA Muhammad Nur Kasman



## RINGKASAN

### MEKANISME KERUSAKAN MIKROTUBULUS MELALUI PERUBAHAN PROTEIN JALUR *MATURATION PROMOTING FACTOR* (MPF) DAN *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE* (MAPK) PADA MATURASI OOSIT *IN VITRO* PASCA VITRIFIKASI

Vitrifikasi oosit merupakan metode kriopreservasi oosit melalui proses pemadatan cepat dengan sedikit volume dan tinggi konsentrasi krioprotektan. Benang *spindle* yang terdiri dari mikrotubulus hasil polimerisasi dimer tubulin  $\alpha$  dan  $\beta$  tubulin, sangat penting untuk penyelesaian meiosis, formasi *polar body* kedua, dan migrasi pronuklei. Vitrifikasi oosit masih dapat menyebabkan penurunan angka maturasi dan perubahan ekspresi protein, perubahan ultrastruktur oosit, perubahan beberapa organela dan ekspresi gen, polimorfisme profil *deoxyribonucleat acid*, dan menekan aktivasi jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Selama maturasi oosit melibatkan aktivasi *maturation promoting factor* (MPF) yang terdiri dari subunit katalitik yaitu *Cyclin dependent kinase1* (CDK1) dan subunit *regulator, Cyclin B*. *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang disebut juga *extracellular regulated kinase* (ERK) merupakan famili protein kinase *serine/threonine* yang memiliki dua isoform *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yaitu *extracellular regulated kinase1* (ERK1) dan *extracellular regulated kinase2* (ERK2). Protein 38 (p38) merupakan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang responsif terhadap rangsangan stress seperti sitokin, perubahan panas, perubahan osmotik, serta terlibat dalam differensiasi sel. Protein 90 (p90<sup>rsk</sup>) merupakan protein kinase yang diaktifkan ERK1/2 pada jalur MAPK yang dapat meningkatkan aktivitas MPF dalam maturasi oosit.

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* laboratorium dengan jenis rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control grup design*. Sampel oosit diperoleh dari kompleks oosit kumulus (KOK) pada ovarium kambing dengan menggunakan teknik aspirasi pada folikel ovarium berdiameter 2-6 mm. Kompleks oosit kumulus (KOK) hasil koleksi dipaparkan secara bertahap ke dalam larutan vitrifikasi yang kemudian oosit dimasukkan ke dalam *hemistraw* dalam nitrogen cair bersuhu  $-196^{\circ}$  C. Kompleks oosit kumulus (KOK) dihangatkan ke dalam larutan *warming* secara bertahap yang dilanjutkan maturasi oosit *in vitro* selama 22 jam dalam inkubator. Pewarnaan oosit untuk mengamati ekspresi protein dengan metode immunositokimia, pewarnaan oosit untuk mengamati tingkat kualitas mikrotubulus dengan metode *immunofluorescent*, dan pewarnaan oosit untuk mengamati tingkat kualitas maturasi dengan pewarnaan aceto orcein. Analisis data menggunakan program SPSS 24 dan *Smart PLS*.

Data hasil analisis statistik pada ekspresi CDK1 dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $2,73 \pm 1,24$  pada vitrifikasi dan  $7,27 \pm 4,39$  pada kontrol. Pada ekspresi *Cyclin B* dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $3,09 \pm 1,41$  pada vitrifikasi dan  $4,18 \pm 2,61$  pada kontrol. Pada ekspresi p38 dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $3,91 \pm 2,69$  pada vitrifikasi dan  $3,59 \pm 0,50$  pada kontrol. Pada ekspresi ERK1/2 dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $2,86 \pm 2,48$  pada vitrifikasi dan  $6,45 \pm 3,69$  pada kontrol. Pada ekspresi p90<sup>rsk</sup> dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $1,59 \pm 0,50$  pada vitrifikasi dan  $2,68 \pm 1,64$  pada kontrol. Pada tingkat kualitas mikrotubulus dengan perolehan nilai proporsi sebesar 36,36 % pada

vitrifikasi dan 68,18 % pada kontrol. Pada tingkat kualitas maturasi dengan perolehan nilai proporsi sebesar 45,45 % pada vitrifikasi dan 77,27 % pada kontrol.

Hasil penelitian ini menemukan bahwa perlakuan vitrifikasi dapat menyebabkan terjadi perubahan protein melalui jalur MPF dan MAPK. Perlakuan vitrifikasi dapat menyebabkan terjadi penurunan ekspresi CDK1 tetapi tidak menyebabkan penurunan subunit *regulator*, *Cyclin B*. Hasil ekspresi CDK1 dan *Cyclin B* pada penelitian ini, dapat disebabkan masih adanya induksi toksik selama vitrifikasi dengan penggunaan konsentrasi krioprotektan tinggi yang berdampak pada perubahan fosforilasi dan defosforilasi protein dalam oosit, sehingga potensinya untuk mempertahankan kerusakan metabolik selama vitrifikasi menjadi berkurang seperti ; perubahan *Cdc25 fosfatase*, *cdc2 activating kinase (CAK)*, *Wee1/Myt1*, dan *p38MAPK*. Hasil penelitian ini juga menemukan bahwa perlakuan vitrifikasi dapat menyebabkan terjadi perubahan ekspresi *ERK1/2*, *p38*, dan *p90<sup>rsk</sup>*. Temuan penelitian ini membuktikan bahwa vitrifikasi oosit dapat menekan aktivasi jalur *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. Penurunan ekspresi *ERK1/2* dan *p38* dimungkinkan karena adanya peningkatan ROS yang dimediasi peningkatan osilasi  $Ca^{2+}$  dalam oosit selama proses vitrifikasi-*warming*, yang memicu terbentuknya ROS sehingga terakumulasi  $Ca^{2+}$  dalam oosit yang tersimpan dalam retikulum endoplasma (RE) melalui mediator *Inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>)*. Penurunan ekspresi *ERK1/2* akibat perlakuan vitrifikasi diikuti oleh penurunan ekspresi *p90<sup>rsk</sup>* yang berdampak pada penurunan kompetensi perkembangan oosit mencapai tahap matang. Protein 90 (*p90<sup>rsk</sup>*) merupakan protein kinase yang diaktifkan *ERK1/2* pada jalur MAPK yang dapat meningkatkan aktivitas MPF dalam maturasi oosit. Hasil penelitian ini menemukan bahwa perlakuan vitrifikasi menyebabkan penurunan tingkat kualitas mikrotubulus dan tingkat kualitas maturasi oosit secara *in vitro*. Perubahan pola distribusi mikrotubulus yang mengatur pergerakan kromosom mencapai oosit matang diduga karena perubahan suhu selama vitrifikasi-*warming*, dan penggunaan jenis dan lama waktu perendaman oosit dalam larutan vitrifikasi-*warming*. Kombinasi vitrifikasi-*warming* dan maturasi *in vitro* memiliki efek merugikan pada organisasi *spindle* dan kromosom dan meningkatkan tingkat abnormalitas benang *spindle*. Penurunan tingkat maturasi oosit setelah vitrifikasi-*warming* dan maturasi *in vitro* dapat disebabkan oleh jenis medium vitrifikasi-*warming* dan perangkat oosit yang digunakan selama perlakuan. Faktor lain bisa disebabkan oleh kondisi kompleks oosit kumulus yang tidak sempurna.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan ekspresi CDK1, tidak terjadi penurunan ekspresi *Cyclin B*, tidak terjadi peningkatan ekspresi *p38*, terjadi penurunan ekspresi *ERK1/2*, terjadi penurunan ekspresi *p90<sup>rsk</sup>*, terjadi penurunan tingkat kualitas mikrotubulus, dan terjadi penurunan tingkat kualitas oosit pada maturasi oosit *in vitro* pasca vitrifikasi.

## SUMMARY

### MECHANISM OF MICROTUBULES DAMAGED BY PROTEIN CHANGES THROUGH MATURATION PROMOTING FACTOR (MPF) AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) PATHWAYS ON *IN VITRO* MATURATION OOCYTES POST VITRIFICATION

Oocyte vitrification is oocyte cryopreservation through a rapid compaction method with low-volume but high concentrate. Spindle thread, which consists of microtubules from  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin dimers polymerization, is crucial for completing meiosis, second polar body formation, and pronuclear migration. However, oocyte vitrification causes the maturation rate to decrease and protein expression changes, oocyte ultrastructural changes, organelles and gene expression changes, deoxyribonucleic acid (DNA) profile polymorphisms, as well as depress mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation. Oocytes maturation involves various activation of the signal transduction pathway to activate maturation promoting factor (MPF) that consists of a catalytic subunit, cyclin-dependent kinase1 (CDK1) and regulatory subunit, Cyclin B. Mitogen-activated protein kinase (MAPK), or so-called extracellular-regulated kinase (ERK), is a family of serine/threonine protein kinases with two mitogen-activated protein kinase (MAPK) isoforms, which are extracellular-regulated kinase1 (ERK1) and extracellular-regulated kinase2 (ERK2). Protein 38 (p38) is mitogen-activated protein kinase (MAPK) responsive to stress stimulation, such as cytokines, heat changes, osmotic changes, and involved in cell differentiation. Protein 90 (p90<sup>rsk</sup>) is a kinase protein activated by ERK1/2 on the MAPK pathway that could intensify MPF activities in oocyte maturation.

This is a true experimental laboratory study and utilizes a post-test-only control group design. Oocyte samples were obtained from the cumulus-oocyte complex (KOK) in the ovary of a goat using an aspiration technique on an ovarian follicle with a 2-6 mm diameter. The collected cumulus-oocyte complex (COC) was exposed step by step to the vitrification solution, and then the oocytes were put into hemistraw in liquid nitrogen at low temperatures. Cumulus oocyte complex (COC) gradually dissolved in a warming solution followed by oocyte *in vitro* maturation for 22 hours in an incubator. Oocyte staining was to observe protein expression with immunohistochemistry method, oocyte staining to observe microtubules quality level with the immunofluorescence method, and oocyte staining to observe maturation quality level with aceto-orcein staining. Data analysis used SPSS 24 and smart PLS program.

The mean  $\pm$  SD of CDK1 expression was  $2.73 \pm 1.24$  on vitrification and  $7.27 \pm 4.39$  on control. On the Cyclin B expression, the mean value  $\pm$  SD was  $3.09 \pm 1.41$  on vitrification and  $4.18 \pm 2.61$  on control. On p38 expression with the mean  $\pm$  SD set by  $3.91 \pm 2.69$  on vitrification and  $3.59 \pm 0.50$  on control. On ERK1/2 expression with the mean  $\pm$  SD set by  $2.86 \pm 2.48$  on vitrification and  $6.45 \pm 3.69$  on control. On the p90<sup>rsk</sup> expression, the mean value  $\pm$  SD was  $1.59 \pm 0.50$  on vitrification and  $2.68 \pm 1.64$  on control. On the microtubules quality level, the proportion rate was 36.36% on vitrification and 68.18% on control. On maturation quality level, the proportion rate was 45.45 % on vitrification and 77.27 % on control.

The results of this research found that vitrification can cause changes in protein through the MPF and MAPK pathways. Vitrification causes a decrease in CDK1 expression but does not cause a reduction in the subunit regulator, Cyclin B. The results of CDK1 and Cyclin B expression in this study, might be due to the toxic induction during vitrification with high cryoprotectant concentration that impacts protein phosphorylation and dephosphorylation changes in oocytes, so it decreases its potential to preserve metabolic damages during vitrification, such as Cdc25 phosphatase changes, cdc2 activating kinase (CAK), Wee1/Myt1, and p38MAPK. The results also prove that vitrification treatment may generate changes in ERK1/2, p38, and p90<sup>rsk</sup> expressions. The results prove that oocyte vitrification can depress mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation. The decreased ERK1/2 and p38 expressions might due to ROS escalation mediated through the increase of oscillation of Ca<sup>2+</sup> in oocytes during the vitrification-warming process. It stimulated ROS formation and accumulated Ca<sup>2+</sup> in oocytes stored in the endoplasmic reticulum (ER) through inositol 1,4,5-triphosphate mediators (IP3). The decreased ERK1/2 expression due to vitrification is followed by decreased of p90<sup>rsk</sup> expression that affects the competency decrease of oocyte development to reach maturation. Protein 90 (p90<sup>rsk</sup>) is a kinase protein activated by ERK1/2 on the MAPK pathway that could intensify MPF activities in oocyte maturation. This study showed that vitrification causes the decrease of microtubules quality level in oocyte vitrification followed by *in vitro* maturation. The microtubule distribution pattern changes regulating the chromosome movement to reach mature oocyte were due to temperature changes during the vitrification-warming and the type and duration of oocyte immersion in vitrification-warming a solution. The combination of vitrification-warming and *in vitro* maturation causes negative impacts on spindle and chromosome organization and increases the spindle thread's abnormality. This study also explain that vitrification treatment causes a decrease in the quality level of the oocyte *in vitro* maturation. The decreased level of oocyte maturation after vitrification and *in vitro* maturation might occur due to the type of vitrification-warming medium and oocytes device during treatment. Another factor behind the decreased level of oocyte maturation is the imperfect condition of the cumulus-oocyte complex.

The conclusions of this study are: there is a decrease of CDK1 expression, no decrease of Cyclin B, no increase of p38 expression, a decrease of ERK1/2 expression, a decrease of p90<sup>rsk</sup> expression, a decrease of microtubules quality level, and a decrease of oocyte quality level on oocyte *in vitro* maturation post vitrification.

## ABSTRAK

Vitrifikasi oosit merupakan metode kriopreservasi oosit melalui proses pemadatan cepat dengan sedikit volume dan tinggi konsentrasi krioprotektan, untuk menghindari terbentuknya kristal es yang dapat merusak oosit. Penelitian ini bertujuan menjelaskan mekanisme vitrifikasi menurunkan tingkat kualitas mikrotubulus melalui perubahan protein jalur *maturation promoting factor* (CDK1 dan *Cyclin B*) dan *mitogen-activated protein kinase* (ERK1/2, p38, dan p90<sup>rsk</sup>) pada maturasi oosit *in vitro*. Kompleks oosit kumulus (KOK) berasal dari ovarium kambing dengan teknik aspirasi yang dilakukan pada folikel ovarium dengan diameter 2-6 mm. Kompleks oosit kumulus (KOK) hasil koleksi dipaparkan ke dalam larutan vitrifikasi-*warming* yang dilanjutkan maturasi oosit *in vitro* selama 22 jam dalam inkubator. Pewarnaan oosit untuk mengamati ekspresi protein dengan metode immunositokimia, pewarnaan oosit untuk mengamati tingkat kualitas mikrotubulus dengan metode immunofluorescent, dan pewarnaan oosit untuk mengamati tingkat kualitas maturasi dengan pewarnaan aceto orcein. Analisis data menggunakan program SPSS 24 dan *smart PLS*. Data hasil analisis statistik pada ekspresi CDK1 dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $2,73 \pm 1,24$  pada vitrifikasi dan  $7,27 \pm 4,39$  pada kontrol. Pada ekspresi *Cyclin B* dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $3,09 \pm 1,41$  pada vitrifikasi dan  $4,18 \pm 2,61$  pada kontrol. Pada ekspresi p38 dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $3,91 \pm 2,69$  pada vitrifikasi dan  $3,59 \pm 0,50$  pada kontrol. Pada ekspresi ERK1/2 dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $2,86 \pm 2,48$  pada vitrifikasi dan  $6,45 \pm 3,69$  pada kontrol. Pada ekspresi p90<sup>rsk</sup> dengan perolehan nilai mean  $\pm$  SD sebesar  $1,59 \pm 0,50$  pada vitrifikasi dan  $2,68 \pm 1,64$  pada kontrol. Pada tingkat kualitas mikrotubulus dengan perolehan nilai proporsi sebesar 36,36 % pada vitrifikasi dan 68,18 % pada kontrol. Pada tingkat kualitas maturasi dengan perolehan nilai proporsi sebesar 45,45 % pada vitrifikasi dan 77,27 % pada kontrol. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa perlakuan vitrifikasi dapat menyebabkan terjadi perubahan protein melalui jalur MPF dan MAPK. Hasil penelitian ini menemukan bahwa terjadi penurunan ekspresi CDK1, tidak terjadi penurunan ekspresi *Cyclin B*, tidak terjadi peningkatan ekspresi p38, terjadi penurunan ekspresi ERK1/2, terjadi penurunan ekspresi p90<sup>rsk</sup>, terjadi penurunan tingkat kualitas mikrotubulus, dan terjadi penurunan tingkat kualitas oosit pada maturasi oosit *in vitro* pasca vitrifikasi.

Kata kunci: oosit, vitrifikasi, maturasi *in vitro*, mikrotubulus, MPF, MAPK

## ABSTRACT

Oocyte vitrification is oocyte cryopreservation through a rapid method with low-volume but high concentrate of cryoprotectants. This study aims to elucidate the vitrification mechanism in decreasing the quality level of microtubules through protein changes by maturation promoting factor (CDK1 and Cyclin B) and mitogen-activated protein kinase (ERK1/2, p38, and p90<sup>rsk</sup>) after *in vitro* maturation. The oocytes were exposed to the vitrification-warming solution followed by *in vitro* maturation. The data analysis utilized SPSS and Smart PLS program. The mean  $\pm$  SD of CDK1 expression was  $2.73 \pm 1.24$  on vitrification, and  $7.27 \pm 4.39$  on control, on the Cyclin B expression, was  $3.09 \pm 1.41$  on vitrification and  $4.18 \pm 2.61$  on control, on p38 expression was  $3.91 \pm 2.69$  on vitrification and  $3.59 \pm 0.50$  on control, on ERK1/2 expression was  $2.68 \pm 2.48$  on vitrification and  $6.45 \pm 3.69$  on control, on the p90<sup>rsk</sup> expression was  $1.59 \pm 0.50$  on vitrification and  $2.68 \pm 1.64$  on control. On microtubules quality level, the proportion rate by 36.36% on vitrification and 68.18% on control. On maturation quality level, the proportion rate by 45.45 % on vitrification and 77.27 % on control. The results show that there is a decrease of CDK1 expression, no decrease of Cyclin B expression, no increase of p38 expression, a decrease of ERK1/2 expression, a decrease of p90<sup>rsk</sup> expression, a decrease of microtubules quality level, and a decrease of oocyte quality level after vitrification and *in vitro* maturation.

Keywords : oocyte, vitrification, *in vitro* maturation, microtubules, MPF, MAPK