



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
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

SALINAN

**KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN
NOMOR 321/UN3.1.1/HK.04/2020**

TENTANG

**PENYANGGAH UJIAN DOKTOR TERBUKA PROGRAM DOKTOR
PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN
ATAS NAMA LUKISIARI AGUSTINI, dr.,Sp.M(K)**

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. ...

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 1732/UN3/2015 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana Periode 2015-2020.

MEMUTUSKAN :

Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN TENTANG PENYANGGAH UJIAN DOKTOR TERBUKA PROGRAM DOKTOR PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN ATAS NAMA LUKISIARI AGUSTINI, dr.,Sp.M(K).

PERTAMA: ...

PERTAMA : Menetapkan Penyanggah Ujian Doktor Terbuka Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran atas nama Lukisiari Agustini, dr.,Sp.M(K) yang dilaksanakan pada tanggal, 27 Agustus 2020 dengan susunan nama sebagai berikut:

1. Prof. Dr. Aryati, dr.,MS.,Sp.PK(K)
2. Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr.,Sp.M(KVR)
3. Prof. Siti Moesbadiani Soebadi Yogiantoro, dr.,Sp.M(K)
4. Prof. Win Darmanto, M.Si.,Ph.D
5. Prof. Dr. Sudjarwo, MS
6. Dr. Soedarsono, dr.,Sp.P(K)
7. Dr. Susilowati Andajani, dr.,MS
8. Dr. Ahmad Suryawan, dr.,Sp.A(K)
9. Dr. Bambang Purwanto, dr.,M.Kes.
10. Prof. Dr. Soetojo, dr.,Sp.U(K)

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 27 Agustus 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. Yang bersangkutan

DISERTASI

**MEKANISME APOPTOSIS PADA KERUSAKAN SEL
GANGLION RETINA AKIBAT PEMBERIAN
ETHAMBUTOL PADA TIKUS *RATTUS NORVEGICUS*
(*A True Experiment in Animal Model*)**



LUKISIARI AGUSTINI

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

DISERTASI

**MEKANISME APOPTOSIS PADA KERUSAKAN SEL GANGLION
RETINA AKIBAT PEMBERIAN ETHAMBUTOL PADA TIKUS
*RATTUS NORVEGICUS***

(A True Experiment in Animal Model)

LUKISIARI AGUSTINI

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

2020

III

**MEKANISME APOPTOSIS PADA KERUSAKAN SEL GANGLION
RETINA AKIBAT PEMBERIAN ETHAMBUTOL PADA TIKUS
RATTUS NORVEGICUS
(*A True Experiment in Animal Model*)**

DISERTASI

**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 : 27 Agustus 2020

Pukul. : 10.00 WIB

LUKISIARI AGUSTINI

NIM 011317017308

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

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

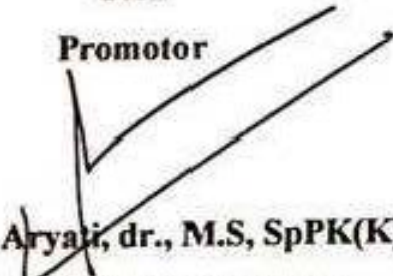
**MEKANISME APOPTOSIS PADA KERUSAKAN SEL GANGLION RETINA
AKIBAT PEMBERIAN ETHAM BUTOL PADA TIKUS *RATTUS NORVEGICUS*
(*A True Experiment in Animal Model*)**

**Telah Ditetujui
Pada Tanggal 27 September 2020
Oleh**

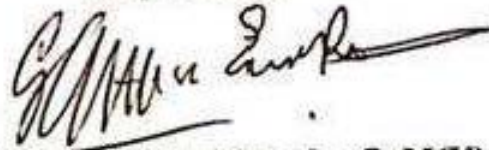
Pada Tanggal 27 September 2020

Oleh

Promotor


**Prof. Dr. Aryati, dr., M.S, SpPK(K)
NIP 19630815 199002 20001**

Ko promotor


**Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., SpM(K)
NIP 19460212 197203 1 001**

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)
pada tanggal 22 Juli 2020**

Panitia Penguji :

- Ketua** : 1. Dr. Bambang Purwanto, dr., MKe
2. Prof. Dr. Aryati, dr., M.S, SpPK(K)
3. Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., SpM(K)
4. Prof. Dr. Winarto, dr., SpMK, SpM(K), DMM
5. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.Si
6. Prof. Dr. Widjiati, M. Si., drh
7. Dr. Budi Utomo, dr., M.Si.
8. Dr. Nurwasis, dr., SpM(K)

RINGKASAN

MEKANISME APOPTOSIS PADA KERUSAKAN SEL GANGLION RETINA AKIBAT PEMBERIAN ETHAM BUTOL PADA TIKUS *RATTUS NORVEGICUS* (*A True Experiment in Animal Model*)

Ethambutol masih merupakan obat lini pertama dari penatalaksanaan tuberkulosis. Neuropati optik toksik ethambutol adalah efek samping yang paling sering dari pemakaian ethambutol yang bersifat reversibel apabila segera dapat diketahui secara dini dan dapat bersifat irreversibel apabila terlambat mendeteksi dan dapat menyebabkan kebutaan yang menetap. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan mekanisme apoptosis SGR yang diduga mendasari terjadinya kejadian neuropati optik toksik ethambutol.

Tingginya insiden tuberkulosis di Indonesia, yang merupakan satu dari 5 negara yang berkontribusi besar pada tingginya angka kejadian tuberkulosis di dunia yang diperkirakan 140 kasus per 100 000 penduduk. Angka kejadian Neuropati optik toksik diperkirakan sebesar 1-5 % dari pemakaian ethambutol, tergantung dari besar dan lamanya pemberian. Banyak studi secara klinis dilakukan termasuk di Indonesia seperti yang dilakukan oleh Azizah (2014), Ardiella (2014), Deniati (2015), Fitriah (2016) dan Indrayani (2018) yang melakukan penelitian berkenaan dengan terjadinya toksik optik neuropati karena pemberian ethambutol pada pasien tuberkulosis. Studi secara molekuler juga dilakukan beberapa peneliti akhir-akhir ini untuk menjelaskan proses patologis yang diduga mendasari kejadian. Kerusakan serabut saraf retina terjadi terutama pada SGR pada pemakaian ethambutol. Kerusakan bahkan terjadinya kematian pada SGR itu diyakini ada. Penyebab kematian diduga karena proses apoptosis pada SGR akan tetapi bagaimana mekanisme secara pasti apa saja yang paling berpengaruh masih belum dapat dijelaskan. Penelitian ini dilakukan untuk mencari model kematian SGR melalui jalur apoptosis mana yang paling berpengaruh menyebabkan kematian SGR dengan dosis 15mg/kgBB/hari berdasarkan lama pemberian.

Penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *randomized group design with time series*. Sebanyak 42 ekor tikus *Rattus norvegicus* dengan kriteria inklusi galur *Sprague dawley* jantan, berat badan 200-250 gram berumur 3-4 bulan, kondisi sehat baik mata maupun kondisi umumnya dan kriteria eksklusi tikus yang dinyatakan oleh dokter hewan terbukti memiliki penyakit baik menular atau berpotensi menularkan penyakit selama menjalani evaluasi ataupun penyakit tidak menular. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok dengan 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan diberi ethambutol dengan dosis 15 mg/kgBB/hari peroral dan pada kelompok kontrol diberikan plasebo, masing masing kelompok diberi perlakuan selama 5, 10 dan 15 hari. Pada kelompok kontrol dan perlakuan kemudian dikorbkan dengan metode *cervical dislocation* dengan menggunakan *rat cocktail anesthesia* lalu mata dienukleasi untuk kepentingan pemeriksaan jaringan retina.

Eksresi SOD₂, MDA, PKC δ , P53, Cyt c, Caspase 3 dan apoptosis diperiksa dengan metode imunohistokimia. Banyaknya ekspresi pada masing-masing variabel dihitung dengan menggunakan cara semikuantitatif menggunakan metode *H-score*. Data yang terkumpul dianalisis secara statistik dengan program R dan dilakukan uji analisis secara bivariat menggunakan uji Kruskal Wallis untuk kemudian dianalisis lagi dengan uji Mann Whitney bila data tidak berdistribusi normal dan uji t_2 sampel bebas bila data berdistribusi normal. Dilakukan analisis korelasi bertahap untuk mengetahui hubungan antar variabel dengan menggunakan uji Spearman.

Hasil penelitian, dari hasil analisis bivariat antara kelompok perlakuan dan kontrol didapatkan penurunan yang signifikan SOD₂ dengan $p=0,002$ pada 5 hari, $p=0,013$ pada 10 hari dan $p=0,018$ pada 15 hari; peningkatan signifikan MDA 5 hari $p=0,05$, 10 hari $p=0,017$, 15 hari $p=0,002$; peningkatan yang tidak signifikan PKC δ 5 hari $p=0,95$, 10 hari $p=0,014$, 15 hari $p=0,002$; peningkatan yang tidak signifikan pada p53 5 hari $p=0,18$, signifikan pada 10 hari $p=0,025$, 15 hari $p=0,002$; Cyt c 5 hari $p=0,004$, 10 hari $p=0,001$, 15 hari $p=0,001$; Caspase 3 pada 5 hari $p=0,002$, 10 hari $p=0,025$, 15 hari $p=0,002$ dan apoptosis 5 hari $p=0,002$, 10 hari $p=0,002$, 15 hari $p=0,002$. Dari hasil analistik kausalistik menggunakan uji Spearman pemberian ethambutol mengakibatkan penurunan signifikan SOD₂ dengan $p=0,001$ $rs=-66\%$, pengaruh kenaikan signifikan SOD₂ terhadap MDA dengan $p=0,003$ $rs=-45\%$, MDA terhadap kenaikan signifikan Cyt c dengan $p=0,001$ $rs=66\%$, Cyt c terhadap kenaikan apoptosis $p=0,001$ $rs=79\%$ dan p53 yang berpengaruh pada kenaikan Cyt c dengan $p=0,001$ $rs=71\%$.

Kesimpulan penelitian ini adalah paska pemberian ethambutol dosis 15 mg/kgBB hari mengakibatkan penurunan SOD₂, peningkatan MDA, p53, Cyt c, Caspase 3 merupakan biomarker yang penting untuk mendeteksi adanya apoptosis pada SGR.

SUMMARY

MECHANISM OF APOPTOSIS RETINAL GANGLION CELLS RATTUS NORVEGICUS CAUSED BY ETHAMBUTOL *(A True Experiment in Animal Model)*

Ethambutol is still the first-line drug for tuberculosis management. Toxic optic neuropathy is the most frequent side effect of using ethambutol which is reversible if it can be identified early and can be irreversible if it is too late to detect and can cause permanent blindness. The purpose of this study is to explain the mechanism of SGR apoptosis which is thought to underlie the occurrence of ethambutol toxic optic neuropathy.

The high incidence of tuberculosis in Indonesia, which is one of the 5 countries that has contributed greatly to the high incidence of tuberculosis in the world, is estimated at 140 cases per 100 000 population. The incidence of toxic optic neuropathy is estimated at 1-5% of the use of ethambutol, depending on the size and duration of administration. Many clinical studies have been conducted including in Indonesia such as those conducted by Azizah (2014), Ardiella (2014), Deniati (2015), Fitriah (2016) and Indrayani (2018) who conducted research regarding the occurrence of toxic optic neuropathy due to ethambutol administration to patients. tuberculosis. Molecular studies have also been carried out by several researchers recently to explain the pathological processes that are thought to underlie events. Retinal nerve fiber damage occurs especially in SGR with ethambutol. The damage and even death to the SGR are believed to exist. The cause of death is thought to be due to the apoptotic process in SGR, but how exactly the mechanism is the most influential still cannot be explained. This study was conducted to find a model of SGR mortality through the apoptotic route which had the most effect on causing SGR mortality at a dose of 15mg / kgBW / day based on the length of administration.

This research is a true experimental design with a randomized group design with time series. A total of 42 *Rattus norvegicus* rats with inclusion criteria for the male Sprague dawley strain, 200-250 grams of body weight, 3-4 months old, healthy conditions in both eyes and general conditions and the exclusion criteria for rats stated by veterinarians were proven to have either infectious or potentially infectious diseases. disease during evaluation or non-communicable disease. Rats were divided into 6 groups with 3 control groups and 3 treatment groups. The treatment group was given ethambutol at a dose of 15 mg / kgBW / day orally and in the control group was given a placebo, each group was given treatment for 5, 10 and 15 days. The control and treatment groups were sacrificed with the cervical dislocation method using rat cocktail anesthesia and then the eyes were enucleated for the purposes of examining the retinal tissue.

The expression of SOD2, MDA, PKC δ , P53, Cyt c, Caspase 3 and apoptosis were examined by immunohistochemical methods. The number of expressions in each variable is calculated using a semi-quantitative method using the H-score method. The collected

data were analyzed statistically with the R program and carried out by bivariate analysis tests using the Kruskal Wallis test and then analyzed again with the Mann Whitney test if the data were not normally distributed and the t_2 free sample test if the data were normally distributed. A stepwise correlation analysis is performed to determine the relationship between variables using the Spearman test.

Result of the study, the bivariate analytic showed ethambutol affect in significant decreased in expression of SOD₂ with $p=0,002$ in 5 days, $p=0,013$ in 10 days and $p=0,018$ in 15 days; significant increased MDA in 5 days with $p=0,05$, 10 days with $p=0,017$, 15 days with $p=0,002$; insignificant increased PKC δ in 5 days with $p=0,95$, 10 days with $p=0,014$, 15 days with $p=0,002$; insignificant increased p53 in 5 days with $p=0,18$, significant increased in 10 days with $p=0,025$, 15 days with $p=0,002$; significant increased Cyt c in 5 days with $p=0,004$, 10 days with $p=0,001$, 15 days with $p=0,001$; significant increased Caspase 3 in 5 days with $p=0,002$, 10 days with $p=0,025$, 15 days with $p=0,002$ and apoptosis in 5 days with $p=0,002$, 10 days with $p=0,002$, 15 days with $p=0,002$. The result of causalystic path analysis used Spearman test. Ethambutol caused significant decreased expression of SOD₂ with $p=0,001$ $r_s=-66\%$, significant correlation between SOD₂ to MDA with $p=0,003$ $r_s=-45\%$, MDA to Cyt c with $p=0,001$ $r_s=66\%$, Cyt c to apoptosis $p=0,001$ $r_s=79\%$ and between p53 to Cyt c with $p=0,001$ $r_s=71\%$

Conclusion of this study is that mechanism of apoptosis of RGC caused by ethambutol was showed via decreased of expression SOD₂, increased expression of MDA, p 53, Cyt c, Caspase 3 and expression of apoptosis. These biomarkers are essential to detect apoptosis as one of mechanism in cell death.

ABSTRACT

APOPTOSIS MECHANISM OF RETINAL GANGLION CELLS RATTUS NORVEGICUS INDUCED BY ETHAMBUTOL (A True Experiment in Animal Model)

Purpose : Ethambutol is still the first-line drug for tuberculosis management. Toxic optic neuropathy is the most frequent side effect of ethambutol which is reversible if it can be identified early and can be irreversible if it is too late to detect and can cause permanent visual loss. The purpose of this study is to explain the mechanism of apoptosis in RGCs which is thought to underlie the occurrence of ethambutol toxic optic neuropathy.

Materials and methods : This study was a true experiment in animal model with a randomized control group design with time series test. A total of 42 male, adult *Rattus norvegicus* were divided into 6 groups with 3 control groups and 3 treatment groups. The treatment groups were given ethambutol at a dose of 15 mg / kg / day for each group within 5, 10 and 15 days orally using gauge. The rats in the control and treatment groups then sacrificed using cervical dislocation method under rat cocktail anesthesia and then the eye is enucleated for the sake of tissue examination. Expressions of SOD₂, MDA, PKC δ , p53, Cyt c, Caspase 3 and apoptosis were examined by immunohistochemical methods. The collected data was analyzed statistically with the R program. Bivariate analysis was tested with Kruskal Wallis test and then with Mann-Whitney test or t_2 -free sample test. Multivariate analysis was tested with gradual correlation using Spearman test.

Results : Ethambutol affected in significant decreased expression of SOD₂ with $p=0,002$ in 5 days, $p=0,013$ in 10 days and $p=0,018$ in 15 days; significant increased MDA in 5 days with $p=0,05$, 10 days with $p=0,017$, 15 days with $p=0,002$; not significant increased PKC δ in 5 days with $p=0,881$, 10 days with $p=0,160$, 15 days with $p=0,100$; significant increased p53 in 5 days with $p=0,012$, 10 days with $p=0,002$, 15 days with $p=0,001$; significant increased Cyt c in 5 days with $p=0,004$, 10 days with $p=0,001$, 15 days with $p=0,001$; significant increased Caspase 3 in 5 days with $p=0,001$, 10 days with $p=0,003$, 15 days with $p=0,001$ and apoptosis in 5 days with $p=0,001$, 10 days with $p=0,001$, 15 days with $p=0,001$. The result of causalystic path analysis used Spearman test. Ethambutol caused significant decreased expression of SOD₂ with $p=0,001$ $rs=-63\%$, significant correlation between SOD₂ to MDA with $p=0,003$ $rs=-45\%$, MDA to Cyt c with $p=0,001$ $rs=66\%$, Cyt c to apoptosis $p=0,001$ $rs=79\%$ and between p53 to Cyt c with $p=0,001$ $rs=71\%$

Conclusion : The mechanism of apoptosis of RGCs caused by ethambutol was showed by decreased of expression SOD₂, increased expression of MDA, p 53, Cyt c, Caspase 3 and apoptosis. These biomarkers are essential to detect apoptosis as one of mechanism in cell death.

Keywords : Apoptosis, ethambutol, toxic, rattus, mechanism, SOD₂