



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

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131

Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472

Website : <http://www.fk.unair.ac.id>, Email : dekan@fk.unair.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor : 3712 /UN3.1.1/PPd/2019

Plh. Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan ini menugaskan :

1. Prof. Dr. H. Budi Santoso, dr., Sp. OG(K) (Ketua)
2. Dr. Widjiati, drh., M.Si (Anggota)
3. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.Si (Anggota)
4. Prof. Arief Boediono, Ph.D., PA Vet(K) (Anggota)
5. Aucky Hinting, dr., Ph.D., Sp. And (Anggota)
6. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes (Anggota)
7. Dr. Margarita M. Maramis, dr., Sp. KJ(K) (Anggota)

Sebagai Ketua /Anggota Panitia Penilai Ujian penilaian naskah disertasi Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas nama **Revi Gama Hatta Novika, S.ST., M.Kes** peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor angkatan tahun 2014 /2015 yang diselenggarakan pada tanggal 28 Mei 2019.

Surat tugas ini diterbitkan sementara untuk menunggu keluarnya Surat Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Surabaya, 15 Mei 2019



DISERTASI

**MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI MPF INTRAFOLIKULER
MELALUI JALUR KORTISOL, HSP70, TORC1 DAN ENaC
PADA KONDISI *DISTRESS* AKIBAT STRESOR KRONIS**



REVI GAMA HATTA NOVIKA

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

DISERTASI

**MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI MPF INTRAFOLIKULER
MELALUI JALUR KORTISOL, HSP70, TORC1 DAN ENaC
PADA KONDISI *DISTRESS* AKIBAT STRESOR KRONIS**



REVI GAMA HATTA NOVIKA

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR FAKULTAS
KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

DISERTASI

**MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI MPF INTRAFOLIKULER
MELALUI JALUR KORTISOL, HSP70, TORC1 DAN ENaC
PADA KONDISI *DISTRESS* AKIBAT STRESOR KRONIS**

REVI GAMA HATTA NOVIKA

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR FAKULTAS
KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

ii

DISERTASI

MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI...

REVI GAMA HATTA NOVIKA

**MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI MPF INTRAFOLIKULER
MELALUI JALUR KORTISOL, HSP70, TORC1 DAN ENaC
PADA KONDISI *DISTRESS* AKIBAT STRESOR KRONIS**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
dan telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 20 Agustus 2019
Pukul : 10.00 – 12.00 WIB**

Oleh :

**REVI GAMA HATTA NOVIKA
011417017328**

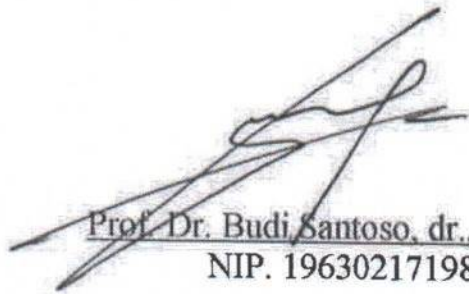
**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR FAKULTAS
KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

LEMBAR PENGESAHAN

MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI MPF INTRAFOLIKULER
MELALUI JALUR KORTISOL, HSP70, TORC1 DAN ENaC
PADA KONDISI *DISTRESS* AKIBAT STRESOR KRONIS


TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 03 SEPTEMBER 2019

Oleh
Promotor



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

Ko-promotor



Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si
NIP. 1962091519900220001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)
Pada tanggal 18 Juli 2019**

Panitia penguji :

- Ketua : Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MS
Anggota : 1. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG (K)
2. Prof. Dr. Widjiati, drh., M. Si
3. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., Msi
4. Prof. Arief Boediono, PhD., PAVet (K)
5. Aucky Hinting, dr., SpAnd, PhD
6. Dr. Margarita M Maramis, dr., Sp.KJ(K)

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 250/UN3.1.1/KD/2019
Tanggal : 05 Agustus 2019

RINGKASAN

**MEKANISME PENURUNAN EKSPRESI MPF INTRAFOLIKULER
MELALUI JALUR KORTISOL, HSP70, TORC1 DAN ENaC
PADA KONDISI *DISTRESS* AKIBAT STRESOR KRONIS**

Fertilisasi *in vitro* (FIV) merupakan proses dimana ovum difertilisasi oleh spermatozoa di luar tubuh. Angka keberhasilan FIV di seluruh dunia masih mencapai 20%-30%. Dalam pelaksanaan FIV memerlukan embrio dengan kualitas bagus yaitu dengan tingkat kematangan maksimal. Upaya untuk meningkatkan kualitas embrio yaitu dengan memperhatikan faktor spermatozoa dan faktor oosit. Salah satu proses yang sangat berpengaruh pada kualitas oosit adalah maturasi oosit. Banyak faktor yang hadir di lingkungan mikro oosit yang sangat berpengaruh terhadap ekspresi beberapa protein, yang selanjutnya menyebabkan perubahan fungsional yang diperlukan untuk maturasi oosit.

Proses maturasi seluler disertai dengan ekspresi protein spesifik. Selama pematangan meiosis oosit, aktivasi protein kinase yaitu MPF memainkan peran dominan. MPF harus diaktifkan agar sel dapat bertransisi dari G2 ke fase M. MPF juga dianggap terlibat pada beberapa tahap penting pembelahan sel, yaitu pemisahan inti, kondensasi kromosom, penyusunan kembali sitoskeleton dan penghentian aktivitas transkripsi.

Distress diperkirakan dapat menyebabkan berbagai perubahan pada lingkungan mikro yang ditandai dengan aktifnya jalur *hipotalamus pituitary adrenal* (HPA) axis, mempengaruhi pelepasan hormon dan fungsi ovarium. Adanya *distress* oleh tubuh akan direspon oleh otak di paraventrikular hipotalamus dengan dikeluarkannya *Corticotropin Releasing Hormon* (CRH) yang kemudian akan meningkatkan *Adreno Corticotropin Hormon* (ACTH) sehingga meningkatkan sekresi hormon kortisol di kelenjar adrenal. Oleh Karena itu adanya stresor dapat menyebabkan aktivasi sumbu HPA yang berkepanjangan dan pelepasan kortisol yang berlebihan.

Peningkatan kortisol dapat mengaktifkan system imun dan menghambat sekresi protein. Apabila HSP70 memainkan peranannya sebagai protein chaperon, maka HSP70 akan bersifat sitoprotektif. Namun diperkirakan pelepasan kortisol yang berlebihan akibat *distress* memodulasi peningkatan *heat shock protein 70* (HSP70) yang kemungkinan tidak memainkan peran sitoprotektifnya dan selanjutnya akan mempengaruhi sintesis protein melalui jalur phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt). PI3K-Akt memainkan peran kunci dalam respons seluler terhadap proliferasi sel, apoptosis, perbaikan DNA, dan sintesis protein.

Hambatan persinyalan PI3K-Akt diperkirakan mengakibatkan penghambatan TORC1. Penghambatan TORC1 diperkirakan dapat mempengaruhi aktivasi dari *Maturation promoting factor* (MPF), karena TORC1 merupakan protein yang berperan mengaktifkan translasi protein agar sel dapat tumbuh.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian *randomized post test only control group design*.

Dalam rancangan penelitian ini ada dua kelompok yang dibagi secara random yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan diberi paparan bising 95 dB 4jam/hari selama 5 hari berturut-turut kemudian pada hari ke 5 post diberi paparan bising langsung dilakukan terminasi dan dilakukan pemeriksaan kadar kortisol, ekspresi HSP70, ekspresi ENaC, ekspresi TORC1 dan ekspresi MPF. Sedangkan kelompok kontrol tidak diberi paparan bising namun terminasi dilakukan pada hari yang sama kemudian dilakukan pemeriksaan kadar kortisol, ekspresi HSP70, ekspresi ENaC, ekspresi TORC1 dan ekspresi MPF.. Analisis data untuk mengetahui beda ekspresi protein variable penelitian dilakukan uji *multivariate Anova*. Untuk menentukan jalur yang dominan digunakan analisis jalur.

Hasil analisis menunjukkan bahwa adanya paparan stressor meningkatkan kadar kortisol ($6,98 \pm 1,14$ vs $10,4 \pm 1,02$, $p=0,000$), ekspresi HSP70 ($7,16 \pm 0,6$ vs $11,45 \pm 0,72$, $p=0,000$), dan menurunkan ekspresi TORC1 ($11,35 \pm 0,89$ vs $7,93 \pm 0,66$, $p=0,000$), ekspresi MPF ($6,16 \pm 1,68$ vs $2,11 \pm 0,85$, $p=0,000$), serta tidak berpengaruh terhadap ekspresi ENaC ($10,82 \pm 1,57$ vs $11,69 \pm 0,55$, $p=0,115$). Analisis jalur menunjukkan bahwa *distress* mempengaruhi peningkatan kadar kortisol ($\beta=0,845$ $p=0,000$), kortisol mempengaruhi peningkatan ekspresi HSP70 ($\beta=0,767$ $p=0,000$), HSP70 mempengaruhi penurunan ekspresi TORC1 ($\beta=0,810$ $p=0,000$), TORC1 mempengaruhi penurunan ekspresi MPF ($\beta=0,769$ $p=0,000$).

Kesimpulan penelitian ini adalah *distress* meningkatkan kadar kortisol dan ekspresi HSP70, menurunkan ekspresi TORC1 dan ekspresi MPF, serta tidak berpengaruh terhadap ekspresi ENaC. *Distress* meningkatkan kadar kortisol yang selanjutnya meningkatkan ekspresi HSP70. Peningkatan HSP70 menyebabkan perubahan lingkungan mikro oosit, ekspresi berlebih dari HSP70 memiliki efek yang berbeda dan berlawanan pada ekspresi fungsional. Dalam penelitian ini over ekspresi HSP70 menyebabkan penurunan ekspresi TORC1 yang pada akhirnya menyebabkan penurunan ekspresi MPF.

SUMMARY

MECHANISM OF DECREASING INTRAFOLLICULAR MPF EXPRESSION BY CORTISOL, HSP70, TORC1 AND ENaC PATHWAY IN DISTRESS DUE TO CHRONIC STRESSOR

In vitro fertilization (IVF) is the process which ovum is fertilized by spermatozoa outside the body. In vitro fertilization (IVF) implementation requires an in vitro embryo with good quality. Efforts to improve embryo quality are by observing spermatozoa and oocyte factors. The process that greatly influences the oocytes quality is oocyte maturation. Many factors are present in the oocyte microenvironment which greatly influences the expression of several proteins, which in turn causes functional changes needed for oocyte maturation.

Cellular maturation process is accompanied by specific protein expression. During the maturation of meiosis oocytes, activation of protein kinase, MPF plays a dominant role. MPF must be activated so that the cell can transition from G2 to M phase. MPF is also considered to be involved in several important stages of cell division, namely core separation, chromosome condensation, cytoskeleton rearrangement and cessation of transcription activity.

Distress is thought to cause various changes in the microenvironment that are characterized by the active hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis, affecting hormone release and ovarian function. The presence of stressors by the body will be responded to by the brain in the hypothalamic paraventricular by the release of Corticotropin Releasing Hormone (CRH) which will then increase Adreno Corticotropin Hormone (ACTH) thereby increasing the secretion of the cortisol hormone in the adrenal gland. Therefore the presence of stressor can lead to prolonged activation of the HPA axis and excessive release of cortisol.

Cortisol release is thought to modulate the expression of heat shock protein 70 (HSP70) which is also a key component in modulating the stress response. If HSP70 plays its role as a chaperon protein, HSP70 will be cytoprotective. However, it is estimated that excessive release of cortisol due to distress modulates the increase in heat shock protein 70 (HSP70) which may not play a cytoprotective role and will subsequently affect protein synthesis via the phosphatidylinositol-3-kinase / protein kinase B (PI3K-Akt) pathway. PI3K-Akt plays a key role in the cellular response to cell proliferation, apoptosis, DNA repair, and protein synthesis.

This research is a laboratory experimental study using a randomized post-test only control group design. There were two groups divided randomly, the control and experimental group. The experimental group was given 95 dB 4hours / day noisy exposure for 5 days and in the 5th day would terminate after noise exposure then cortisol levels, HSP70 expression, ENaC expression, TORC1 expression and MPF expression. The control group was not given noise exposure but the termination was carried out in the same day and then examined for cortisol levels, HSP70 expression, ENaC expression, TORC1 expression and MPF expression. The data analysis to

determine the difference in variable expression was carried out by multivariate Anova and path analysis is used to determine the dominant path.

The analysis showed that stressors exposure increased cortisol levels (6.98 ± 1.14 vs 10.4 ± 1.02 , $p = 0,000$), HSP70 expression (7.16 ± 0.6 vs 11.45 ± 0.72 , $p = 0,000$), and decreased the expression of TORC1 (11.35 ± 0.89 vs 7.93 ± 0.66 , $p = 0,000$), MPF expression (6.16 ± 1.68 vs 2.11 ± 0.85 , $p = 0,000$), and no effect on ENaC expression (10.82 ± 1.57 vs 11.69 ± 0.55 , $p = 0.115$). Path analysis shows that exposure to stressors affects the increase in cortisol levels ($\beta = 0.845$ $p = 0,000$), cortisol affects the increase in HSP70 expression ($\beta = 0.767$ $p = 0,000$), HSP70 affects the decrease in TORC1 expression ($\beta = 0.810$ $p = 0,000$), TORC1 affects the decrease MPF expression ($\beta = 0.769$ $p = 0,000$).

The study conclude that stressor exposure increases cortisol levels and HSP70 expression, decreases TORC1 expression and MPF expression, and does not affect ENaC expression. Exposure to stressors increases cortisol levels which further increases HSP70 expression. Increased HSP70 causes changes in the micro-oocyte environment, the overexpression of Hsp70 has different and opposite effects on functional expression. In this study over expression of HSP70 caused a decrease in TORC1 expression which ultimately affected the expression of MPF.

ABSTRACT

**MECHANISM OF DECREASING INTRAFOLLICULAR MPF EXPRESSION
BY CORTISOL, HSP70, TORC1 AND ENaC PATHWAY
IN DISTRESS DUE TO CHRONIC STRESSOR**

Revi Gama Hatta Novika

Introduction : In vitro fertilization (IVF) implementation requires an in vitro embryo with good quality by observing spermatozoa and oocyte maturation. Many factors are present in the oocyte microenvironment which greatly influences the expression of several proteins, which in turn causes functional changes needed for oocyte maturation.

Methods : Experimental laboratory with Randomized Post Test Only Control Group Design. Divided into two groups, experimental and control groups. The experimental group was given a 95 dB 4 hours/day noisy exposure for 5 days. Both of group were examined for cortisol levels, HSP70 expression, ENaC expression, TORC1 expression and MPF expression. Data analyzed by multivariate analysis. The effect of a variable on other variables was assessed using path analysis in SPSS.

Result : The analysis showed that stressors exposure increased cortisol levels (6.98 ± 1.14 vs 10.4 ± 1.02 , $p=0,000$), HSP70 expression (7.16 ± 0.6 vs 11.45 ± 0.72 , $p=0,000$), and decreased the expression of TORC1 (11.35 ± 0.89 vs 7.93 ± 0.66 , $p=0,000$), MPF expression (6.16 ± 1.68 vs 2.11 ± 0.85 , $p=0,000$), and no effect on ENaC expression (10.82 ± 1.57 vs 11.69 ± 0.55 , $p=0.115$). Path analysis showed that stressors exposure affects the increase in cortisol levels ($\beta=0.845$), cortisol affects the increase in HSP70 expression ($\beta=0.767$), HSP70 affects the decrease in TORC1 expression ($\beta=0.810$), TORC1 affects the decrease MPF expression ($\beta=0.769$).

Conclusion : The study conclude that distress decreased MPF expression through cortisol, HSP70 and TORC1.

Keywords : Distress, oocyte, Maturation Promoting Factor