

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL *CRUSH INJURY* SARAF ISIADIKUS**



VALENTINUS BESIN

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

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL *CRUSH INJURY* SARAF ISIADIKUS**



VALENTINUS BESIN
011717017309

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

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL *CRUSH INJURY* SARAF ISIADIKUS**

VALENTINUS BESIN

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

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL *CRUSH INJURY* SARAF ISIADIKUS**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
pada hari: Rabu
tanggal: 30 Maret 2022
pukul: 10.00-12.00 WIB**

Oleh:

**VALENTINUS BESIN
011717017309**

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

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL *CRUSH INJURY* SARAF ISIADIKUS**

**TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 1 APRIL 2022**

Oleh
Promotor



Prof. Dr. Abdul Hafid Bajamal, dr., Sp.BS(K)

NIP. 194904081976031001

Kopromotor



Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K)

NIP. 195602141985021001

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

Panitia penguji:

- Ketua : 1. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.Si.
- Anggota : 2. Prof. Dr. Abdul Hafid Bajamal, dr., Sp.BS(K)
3. Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K)
4. Prof. Dr. Mangestuti Agil, MS, Apt.
5. Prof. Dr. Djanggan Sargowo, dr., Sp.PD, SpJP(K), FIHA,
FACC, FCAPC, FESC, FASCC
6. Dr. Budi Utomo., dr., M.Kes.
7. Dr. M. Arifin Parenrengi, dr., Sp.BS(K)
8. Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K)

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor 87/UN3.1.1/HK/2022
Tanggal 16 Februari 2022

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Valentinus Besin, dr., Sp.N
NIM : 011717017309
Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Alamat / No. Telp : Makarya Binangun XA-2, Sidoarjo / 081938010500

dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli, benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas-namakan saya, serta bukan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiatism*) hasil karya orang lain. Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik 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. 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, 2 Februari 2022
Yang membuat pernyataan,



Valentinus Besin
011717017309

UCAPAN TERIMA KASIH

Salam sejahtera,

Puji syukur kepada Tuhan atas segala rahmat dan kasihNya, sehingga disertasi dengan judul “Pengaruh Pemberian Timokuinon Terhadap Imunitas Alamiah dan Adaptif Pada Tikus Putih Model *Crush Injury* Saraf Isiadikus” dapat diselesaikan. Penghormatan tertinggi penulis hanturkan kepada Almarhum Prof. Dr. Moh. Hasan Machfoed, dr., Sp.S(K), MS. Beliau semasa hidupnya memberikan rekomendasi kepada penulis untuk menempuh pendidikan doktoral, dan menjadi penasehat akademik, kopromotor, penguji ujian kualifikasi, serta ujian usulan riset disertasi. Sejumlah masukan, saran, dan semangat telah beliau berikan kepada penulis selama menempuh pendidikan doktoral.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis hanturkan kepada Prof. Dr. Abdul Hafid Bajamal, dr., Sp.BS(K) selaku promotor. Beliau di tengah kesibukannya berkenan meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan doktoral. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K) selaku kopromotor, yang berkenan memberikan saran dan koreksi atas penelitian ini. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada seluruh dosen penguji Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K); Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc.,Sp.Par(K); Prof. Dr. Drs. Suprpto Ma’at, Apt., MS; Prof. Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.Si.; Prof. Dr. Mangestuti Agil, MS, Apt.; Prof. Dr. Djanggan Sargowo, dr., Sp.PD, SpJP(K), FIHA, FACC, FCAPC, FESC, FASCC; Prof. Dr. Ahmad Faried, SpBS(K), PhD., FICS; Dr. Paulus Sugianto, dr., Sp.S(K); Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si; Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes; Dr. Windhu Purnomo, dr.,

MS; dan Dr. M. Arifin Parenrengi, dr., Sp.BS(K) atas bimbingan dan sarannya mulai dari ujian kualifikasi sampai dengan ujian terbuka.

Ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Muhammad Nasih, S.E., M.T., CMA., CA selaku Rektor Universitas Airlangga; Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga; dan Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr. Sp.OG(K) selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas kesempatan bagi penulis untuk menyelesaikan pendidikan doctoral pada Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Ucapan terima kasih juga penulis hanturkan kepada segenap dosen pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Terimakasih kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga; Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr., MS., Sp.PK(K); Dr. Paulus Budiono Notopuro, dr., Sp.PK(K); Kes; Abdul Hadi Furqoni S.Kep., M.Si; Bu Nita; Bapak Heri; Bapak Choirul; Bapak Alfian; staf laboratorium hewan coba Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga; staf Litbang dan Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga; serta staf *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga yang telah membantu pelaksanaan penelitian pada disertasi ini.

Terima kasih juga penulis sampaikan ke Dr. Mala Kurniati., S.Si., M.Biomed; Dr. William Sayogo, dr., M.Imun.; Dr. Satuman, S.Si., M.Kes, dan semua teman angkatan 2017/2018 Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang membantu secara

langsung dan tidak langsung pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih kepada Bu Fitri, Bu Adri, Pak Oki, Bu Mita, dan seluruh staf administrasi Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang membantu proses administrasi selama penulis menempuh pendidikan doctoral.

Terima kasih juga penulis sampaikan ke rektor, para wakil rektor Universitas Surabaya, dekan, para wakil dekan, kaprodi dan semua rekan dosen Fakultas Kedokteran Universitas Surabaya serta direktur, manajer Yanmed, dan staf RS Premier Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menempuh pendidikan doctoral ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada istri penulis Agatha Efrad Saputri atas kesabaran, doa, dan dukungan selama penulis menempuh pendidikan dan melakukan penelitian. Rasa hormat dan terima kasih juga penulis sampaikan kepada kedua orang tua Bapak Gaspar Besin dan Ibu Srijati yang telah mengasuh, mendidik, dan menunjang karir penulis dari kanak-kanak hingga saat ini; dan kepada kedua mertua penulis Bapak Efrad Sugianto dan Ibu Priscilla Ingrid atas doa dan perhatiannya terhadap penulis, serta kepada semua keluarga besar yang telah mendukung penulis selama menempuh pendidikan.

Terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan doa dan bantuan dalam penyusunan disertasi ini. Akhir kata, penulis mohon maaf atas segala kesalahan dalam penulisan naskah disertasi ini. Besar harapan penulis agar disertasi ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu kedokteran.

Surabaya, 2 Februari 2022

Penulis,
Valentinus Besin

RINGKASAN

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL *CRUSH INJURY* SARAF ISIADIKUS**

Crush injury adalah cedera saraf tepi yang berasal dari kompresi traumatik akut karena obyek tumpul. Salah satu saraf tepi ekstremitas inferior yang sering mengalami cedera adalah saraf isiadikus. Angka pemulihan sempurna pada kelemahan saraf isiadikus karena fraktur hanya sebesar 57%. Lesi komplis saraf isiadikus yang tidak disertai pemulihan akan menyebabkan 100% kecacatan tungkai. Sejumlah terapi pemulihan fungsional sensorik dan motorik cedera saraf tepi yang telah dilakukan adalah pembedahan, medikamentosa, stimulasi elektrik, dan terapi herbal. Semua terapi ini belum memberikan hasil yang optimal.

Timokuinon adalah salah satu terapi herbal yang dapat meningkatkan performa motorik setelah *crush injury* saraf isiadikus. Efek neuroprotektif timokuinon diduga melalui inhibisi NF- κ B. Timokuinon juga memodulasi respon imun adaptif. Tujuan umum penelitian adalah menjelaskan pengaruh pemberian timokuinon terhadap imunitas alamiah dan adaptif pada tikus putih model *crush injury* saraf isiadikus. Jika pemberian timokuinon terbukti memiliki pengaruh terhadap imunitas alamiah dan adaptif pada tikus putih model *crush injury* saraf isiadikus, maka timokuinon dapat dikembangkan melalui uji klinis lebih lanjut sebagai terapi komplementer pada cedera saraf tepi tipe *crush injury*.

Penelitian ini dinyatakan laik etik dengan keterangan kelaikan etik 4/EC/KEPK/FKUA/2021. Rancangan penelitian ini adalah penelitian *true experimental, single blind, time series, post-test only controlled group design*. Subyek penelitian adalah *Rattus norvegicus* jenis wistar, berkelamin jantan, berusia 18-20 minggu, berat badan 300- 350 gram per ekor, dan kondisi motorik sehat. Model *crush injury* saraf isiadikus diperoleh dari penekanan *forseps* hemostatik Kelly pada 10 mm superior dari *trifurkasio* saraf isiadikus kiri. Penekanan dilakukan selama 30 detik dan pada jepitan pengkait pertama. Subyek dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok normal, kelompok *crush injury* yang mendapat terapi plasebo minyak jagung, kelompok *crush injury* yang

mendapat timokuinon 100 mg/kg/hari, dan kelompok *crush injury* yang mendapat timokuinon 250 mg/kg/hari. Variabel bebas penelitian adalah timokuinon. Variabel terikat penelitian adalah kadar IgG. Variabel antara penelitian adalah ekspresi NF- κ B sel Schwann, kadar TNF- α , kadar IL-1 β , kadar MMP-9, kadar IL-10, dan rasio CD4⁺:CD8⁺. Pengukuran ekspresi NF- κ B sel Schwann dan rasio CD4⁺:CD8⁺ menggunakan metode *flow cytometry*. Pengukuran kadar TNF- α , IL-1 β , MMP-9, IL-10, dan IgG menggunakan metode ELISA.

Uji statistik parametrik dilakukan untuk menentukan perbedaan kadar IL-1 β antar kelompok. Uji statistik non-parametrik dilakukan untuk menentukan perbedaan ekspresi NF- κ B, kadar TNF- α , kadar MMP-9, kadar IL-10, kadar IgG, dan rasio CD4⁺:CD8⁺ antar kelompok. Nilai median ekspresi NF- κ B kelompok timokuinon 250 mg/kg (16,94) lebih rendah dan signifikan daripada kelompok plasebo (28,39; $p=0,004$), kelompok normal (25,30; $p=0,001$), dan kelompok timokuinon 100 mg/kg (25,57; $p=0,001$) pada uji beda 18 jam setelah cedera. Tidak didapatkan perbedaan signifikan nilai rata-rata kadar IL-1 β pada uji beda kelompok timokuinon 250 mg/kg dan 100 mg/kg ($p>0,05$). Tidak didapatkan perbedaan signifikan nilai median kadar TNF- α , kadar MMP-9, kadar IL-10, kadar IgG, dan rasio CD4⁺:CD8⁺ pada uji beda kelompok timokuinon 250 mg/kg dan 100 mg/kg ($p>0,05$).

Jalur penurunan kadar TNF- α dan MMP-9 melalui inhibisi NF- κ B sel Schwann pada kedua kelompok timokuinon adalah signifikan ($p=0,000$). Jalur penurunan kadar IL-1 β melalui inhibisi NF- κ B sel Schwann hanya signifikan pada kelompok timokuinon 250 mg/kg ($p=0,045$). Jalur penurunan kadar IL-10 dan IgG melalui inhibisi MMP-9 dan NF- κ B hanya signifikan pada kelompok timokuinon 250 mg/kg ($p<0,05$). Jalur peningkatan signifikan rasio CD4⁺:CD8⁺ didapatkan pada kedua kelompok timokuinon ($p=0,000$).

Didapatkan dua temuan baru pada penelitian ini. Temuan baru pertama adalah pemberian timokuinon secara oral 250 mg/kg/hari yang dimulai sesegera mungkin setelah cedera, dapat menurunkan kadar IgG pada distal lesi tikus putih model *crush injury* saraf isiadikus. Penurunan ini berasal dari inhibisi ekspresi NF- κ B sel Schwann. Temuan baru kedua adalah pemberian timokuinon secara oral 100 mg/kg/hari dan 250 mg/kg/hari yang dimulai sesegera mungkin setelah

cedera, dapat meningkatkan rasio $CD4^+ : CD8^+$ darah tepi pada tikus putih model *crush injury* saraf isiadikus.

Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perbedaan ekspresi NF- κ B sel Schwann, kadar IL-1 β , kadar IL-10, kadar IgG dan tidak terdapat perbedaan kadar TNF- α , kadar MMP-9 antara kelompok plasebo, timokuinon 100 mg/kg/hari, dan timokuinon 250 mg/kg/hari, pada segmen distal lesi saraf tikus putih model *crush injury* saraf isiadikus. Terdapat perbedaan rasio $CD4^+ : CD8^+$ antara kelompok plasebo, timokuinon 100 mg/kg/hari, dan timokuinon 250 mg/kg/hari, pada darah tepi tikus putih model *crush injury* saraf isiadikus (pemberian kedua dosis timokuinon meningkatkan rasio $CD4^+ : CD8^+$ darah tepi). Pemberian timokuinon 250 mg/kg/hari memiliki jalur imunitas alamiah dan adaptif yang lebih baik daripada timokuinon 100 mg/kg/hari. Pemberian timokuinon 250 mg/kg/hari memiliki jalur imunitas alamiah berupa penurunan signifikan kadar TNF- α , IL-1 β , dan MMP-9 lokal melalui inhibisi ekspresi NF- κ B sel Schwan distal lesi. Pemberian timokuinon 250 mg/kg/hari juga memiliki jalur imunitas adaptif berupa penurunan signifikan kadar IgG dan IL-10 melalui inhibisi ekspresi NF- κ B dan peningkatan signifikan rasio $CD4^+ : CD8^+$ darah tepi.

Didapatkan empat saran penting untuk penelitian lebih lanjut. Saran pertama adalah penelitian jalur penurunan kadar IgG distal lesi saraf pada pemberian timokuinon memerlukan pemeriksaan sel makrofag, kadar IL-23, variasi subklas dan pola glikosilasi/sialilasi IgG, sejak hari pertama hingga empat belas hari cedera. Saran kedua adalah penelitian jalur peningkatan rasio $CD4^+ : CD8^+$ darah tepi pada pemberian timokuinon memerlukan pemeriksaan kadar IL-6, aktivitas sel T $CD4^+ CD25^+$, dan rasio $CD4^+ : CD8^+$ darah tepi, sejak hari pertama hingga empat belas hari cedera. Saran ketiga adalah pemeriksaan kadar IL-1 β perlu mengukur profil kadar kalsium dan lipid darah. Saran keempat adalah penelitian jalur imunitas alamiah dan adaptif pada pemberian timokuinon perlu melibatkan jalur regulasi apoptosis sel-sel imunitas.

SUMMARY

THE EFFECTS OF THYMOQUINONE ADMINISTRATION ON INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY OF SCIATIC NERVE CRUSH INJURY IN WHITE RATS MODEL

Crush injury is a peripheral nerve injury caused by acute traumatic compression of blunt object. One of the peripheral nerves of the lower extremities often injured is the sciatic nerve. The complete recovery rate for sciatic nerve weakness due to fracture is only 57%. Complete lesion of the sciatic nerve that is not accompanied by recovery will result in 100% limb disability. A number of therapies for sensory and motor functional restoration of peripheral nerve injury which have been given are surgery, medical drug, electrical stimulation, and herbal therapy. This therapies have not given the optimum result.

Thymoquinone is one of the herbal therapies that can improve motor performance after sciatic nerve crush injury. The neuroprotective effect of thymoquinone is its inhibition of NF- κ B effect. Thymoquinone also modulates adaptive immune response. The purpose of this study was to explain the effects of thymoquinone administration on innate and adaptive immunity of sciatic nerve crush injury white rats model. If thymoquinone administration is proven to have effects on innate and adaptive immunity of sciatic nerve crush injury white rat model, then thymoquinone can be developed through further clinical trials as a complementary therapy in crush injury type of peripheral nerve.

This research was declared ethically feasible with a statement of ethical feasibility no. 4/EC/KEPK/FKUA/2021. The research design was a true experimental study, single-blind, time-series, post-test only controlled group design. The subjects were *Rattus norvegicus* Wistar type, male, 18-20 weeks old, body weight 300-350 grams per head, and in healthy motor condition. The sciatic nerve crush injury model was obtained by pressing the Kelly hemostatic forceps at 10 mm superior to the left sciatic nerve trifurcation. The pressure was done for 30 seconds and on the first hook clamp. Subjects were divided into four groups, namely the normal group, the crush injury group with corn oil placebo therapy, the crush injury group receiving 100 mg/kg/day thymoquinone, and the crush injury group receiving 250 mg/kg/day thymoquinone. The independent variable of

the study was thymoquinone. The dependent variable of the study was the IgG levels. The intermediate variables of the studies were NF- κ B expression in Schwann cell, TNF- α , IL-1 β , MMP-9, IL-10 levels, and CD4⁺:CD8⁺ ratio. Measurement of NF- κ B expression in Schwann cell and CD4⁺:CD8⁺ ratio used flow cytometry method. Measurement of TNF- α , IL-1 β , MMP-9, IL-10, and IgG levels used ELISA method.

Parametric test was used to determine the difference in IL-1 β levels between groups. Nonparametric test was used to determine the differences in NF- κ B expression, TNF- α levels, MMP-9 levels, IL-10 levels, IgG levels, and CD4⁺:CD8⁺ ratios between groups. The median value of NF- κ B expression in the thymoquinone 250 mg/kg group (16.94) was lower and significant than the crush injury group (28.39; $p=0.004$), the normal group (25.30; $p=0.001$), and the thymoquinone 100 mg/kg group (25.57; $p=0.001$) at 18 hours after injury. There was no significant difference in the mean values of IL-1 β levels of both thymoquinone groups ($p>0,05$). There were no significant differences in the median values of TNF- α levels, MMP-9 levels, IL-10 levels, IgG levels, and CD4⁺:CD8⁺ ratios of both thymoquinone groups ($p>0,05$).

The pathways for decreasing levels of TNF- α and MMP-9 through inhibition of NF- κ B in Schwann cells in both thymoquinone groups were significant ($p=0.000$). The pathway for decreasing levels of IL-1 β through inhibition of NF- κ B in Schwann cells was only significant in the thymoquinone 250 mg/kg group ($p=0.045$). The pathways for decreasing IL-10 and IgG levels through MMP-9 and NF- κ B inhibition were only significant in the thymoquinone 250 mg/kg group ($p<0.05$). The pathway for increasing CD4⁺:CD8⁺ ratios was significant in both thymoquinone groups ($p=0.000$).

There were two new findings in this study. The first new finding was the oral thymoquinone administration of 250 mg/kg/day, which was started as soon as possible after injury, could reduce the level of IgG in the distal lesion of sciatic nerve crush injury white rat model. This decrease came from the inhibition of NF- κ B expression in Schwann cells. The second new finding was the oral thymoquinone administration of 100 mg/kg/day and 250 mg/kg/day, which were

started as soon as possible after injury, could increase the peripheral blood CD4⁺:CD8⁺ ratio of sciatic nerve crush injury white rat model.

The conclusion of the study is that there are differences in the expression of NF- κ B in Schwann cell, IL-1 β , IL-10, IgG levels and there are no differences in TNF- α , MMP-9 levels between the placebo group, thymoquinone 100 mg/kg/day group, and thymoquinone 250 mg/kg/day group, in the distal segment of nerve lesions of sciatic nerve crush injury in white rat model. There is a difference in the CD4⁺:CD8⁺ ratio between the placebo group, thymoquinone 100 mg/kg/day group, and thymoquinone 250 mg/kg/day group, in the peripheral blood of sciatic nerve crush injury in white rat model (the thymoquinone administration of 100 mg/kg/day and 250 mg/kg/day increase the CD4⁺:CD8⁺ ratio in the peripheral blood). The oral thymoquinone administration of 250 mg/kg/day has better innate and adaptive immune mechanism than 100 mg/kg/day. The oral thymoquinone administration of 250 mg/kg/day has an innate immune mechanism in the form of a significant reduction in local TNF- α , IL-1 β , and MMP-9 level through inhibition of NF- κ B expression in Schwann cells distal to the lesion. The oral thymoquinone administration of 250 mg/kg/day also has an adaptive immune mechanism in the form of reduction in IgG and IL-10 level through inhibition of NF- κ B expression and significantly increases the CD4⁺:CD8⁺ ratio.

There are four important suggestions for future studies. The first suggestion is to study the mechanism of decreasing IgG level distal of nerve lesions on thymoquinone administration requiring examination of macrophage cells, IL-23 level, subclass variations and glycosylation/sialylation patterns of IgG, from the first day to fourteenth day after injury. The second suggestion is to study the mechanism pathway for increasing the CD4⁺:CD8⁺ ratio in peripheral blood on thymoquinone administration, requiring examination of IL-6 level, CD4⁺CD25⁺ T-cell activity, and CD4⁺:CD8⁺ peripheral blood ratio, from the first day to fourteenth day after injury. The third suggestion is that the examination of IL-1 β level is necessary to measure the calcium and blood lipid levels. The fourth suggestion is that research on innate and adaptive immune mechanism pathways

in the administration of thymoquinone needs to involve the regulation of apoptosis of immune cells pathways.

ABSTRAK

**PENGARUH PEMBERIAN TIMOKUINON TERHADAP
IMUNITAS ALAMIAH DAN ADAPTIF PADA TIKUS PUTIH
MODEL CRUSH INJURY SARAF ISIADIKUS**

Valentinus Besin

Pendahuluan:

Crush injury adalah cedera saraf tepi yang berasal dari kompresi traumatik akut obyek tumpul. Saraf tepi ekstremitas inferior yang sering mengalami cedera adalah saraf isiadikus. Timokuinon memiliki efek inhibisi NF- κ B dan modulasi respon imun adaptif.

Tujuan:

Menjelaskan pengaruh pemberian timokuinon secara oral terhadap imunitas alamiah dan adaptif pada *crush injury* saraf isiadikus.

Metode:

Penelitian ini adalah *true experimental, time series, post-test only controlled group design*. Subyek penelitian adalah *Rattus norvegicus* jenis wistar. Model *crush injury* saraf isiadikus diperoleh dari penekanan saraf isiadikus menggunakan *forseps* hemostatik Kelly. Subyek dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok normal, plasebo, timokuinon 100 mg/kg/hari, dan timokuinon 250 mg/kg/hari. Pengukuran ekspresi NF- κ B sel Schwann dan rasio CD4⁺:CD8⁺ darah tepi menggunakan metode *flow cytometry*. Pengukuran kadar TNF- α , IL-1 β , MMP-9, IL-10, dan IgG distal lesi menggunakan metode ELISA.

Hasil:

Ekspresi NF- κ B kelompok timokuinon 250 mg/kg/hari lebih rendah daripada kelompok plasebo, normal, dan timokuinon 100 mg/kg/hari pada 18 jam setelah cedera ($p < 0,05$). Jalur penurunan kadar TNF- α dan MMP-9 melalui inhibisi NF- κ B pada kedua kelompok timokuinon adalah signifikan ($p = 0,000$). Jalur penurunan kadar IL-1 β melalui inhibisi NF- κ B signifikan pada kelompok timokuinon 250 mg/kg/hari ($p = 0,045$). Jalur penurunan kadar IL-10 dan IgG melalui inhibisi MMP-9 dan NF- κ B signifikan pada kelompok timokuinon 250 mg/kg/hari ($p < 0,05$). Jalur peningkatan rasio CD4⁺:CD8⁺ kedua kelompok timokuinon adalah signifikan ($p = 0,000$).

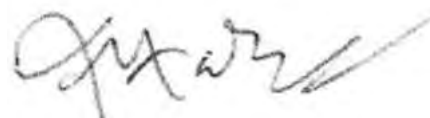
Kesimpulan:

Pemberian timokuinon secara oral 250 mg/kg/hari menurunkan signifikan sitokin inflamasi dan kadar IgG distal lesi melalui inhibisi ekspresi NF- κ B, serta meningkatkan signifikan rasio CD4⁺:CD8⁺ darah tepi pada *crush injury* saraf isiadikus.

Kata kunci:

timokuinon, *crush injury*, saraf isiadikus, imunitas alamiah, imunitas adaptif

Promotor,



Prof. Dr. Abdul Hafid Bajamal, dr., Sp.BS(K)
NIP 194904081976031001

ABSTRACT

THE EFFECTS OF THYMOQUINONE ADMINISTRATION ON INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY OF SCIATIC NERVE CRUSH INJURY IN WHITE RATS MODEL

Valentinus Besin

Introduction:

Crush injury is a peripheral nerve injury caused by acute traumatic compression of blunt object. The peripheral nerve of lower extremity often injured is sciatic nerve. Thymoquinone has NF- κ B inhibitory effects and modulates the adaptive immune response.

Purpose:

To explain the effects of oral thymoquinone administration on innate and adaptive immunity of sciatic nerve crush injury.

Method:

This research was a true-experimental, time-series, post-test only, controlled-group design. The research subject was *Rattus norvegicus* Wistar species. The sciatic nerve crush injury model was obtained by compressing sciatic nerve using Kelly hemostatic forceps. Subjects were divided into normal, placebo, thymoquinone 100mg/kg/day, and 250mg/kg/day group. Measurement of Schwann cell NF- κ B expression and peripheral blood CD4⁺:CD8⁺ ratio used flow cytometry method. Measurement TNF- α , IL-1 β , MMP-9, IL-10, and IgG levels used ELISA method.

Results:

The expression of NF- κ B in thymoquinone 250mg/kg/day group was lower than placebo, normal, and thymoquinone 100mg/kg/day group at 18hours after injury(p<0.05). The pathways for decreasing TNF- α and MMP-9 levels through NF- κ B inhibition in both thymoquinone groups were significant(p=0.000). The pathway for reducing IL-1 β levels through NF- κ B inhibition was significant in thymoquinone 250mg/kg/day group(p=0.045). The pathways for decreasing IL-10 and IgG levels through MMP-9 and NF- κ B inhibition were significant in thymoquinone 250mg/kg/day group(p<0.05). The pathway of increasing CD4⁺:CD8⁺ ratio in both thymoquinone groups was significant(p=0.000).

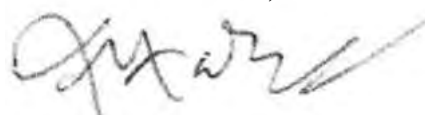
Conclusion:

The oral thymoquinone administration of 250mg/kg/day significantly reduces inflammatory cytokines and IgG levels distal to the lesion, through inhibition of NF- κ B expression, and significantly increases peripheral blood CD4⁺:CD8⁺ ratio in sciatic nerve crush injury.

Keywords:

thymoquinone, crush injury, sciatic nerve, innate immunity, adaptive immunity

Promotor,



Prof. Dr. Abdul Hafid Bajamal, dr., Sp.BS(K)
NIP 194904081976031001

DAFTAR ISI

Sampul Dalam.....	i
Halaman Awal Disertasi.....	ii
Halaman Prasyarat Gelar.....	iii
Lembar Pengesahan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Surat Pernyataan.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN.....	x
SUMMARY.....	xiii
ABSTRAK.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
DAFTAR ISI.....	xix
DAFTAR TABEL.....	xxii
DAFTAR GAMBAR.....	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xxv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan umum.....	5
1.3.2 Tujuan khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat teoritis.....	6
1.4.2 Manfaat praktis.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Crush Injury</i>	7
2.1.1 Perubahan neurobiologi pada <i>crush injury</i>	7
2.1.2 Degenerasi Wallerian.....	8
2.1.3 <i>Toll-like Receptors</i> (TLRs).....	10
2.2 Imunitas Alamiah pada <i>Crush Injury</i>	11
2.2.1 Netrofil.....	11
2.2.2 Sel Schwann.....	12
2.2.3 Makrofag.....	13
2.2.4 Faktor transkripsi <i>Nuclear Factor-kappa B</i> (NF- κ B).....	16
2.2.5 <i>Matrix Metalloproteinase-9</i> (MMP-9).....	17
2.2.6 Sitokin inflamasi.....	18
2.2.7 Regulasi imunitas alamiah.....	21
2.3 Imunitas Adaptif pada <i>Crush Injury</i>	22
2.3.1 Antibodi.....	23
2.3.2 Sel limfosit T.....	24
2.4 Timokuinon.....	25
2.4.1 Farmakokinetik timokuinon.....	26
2.4.2 Farmakodinamik timokuinon.....	28
2.4.2.1 Faktor transkripsi <i>Nuclear Factor-kappa B</i>	28

2.4.2.2 Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)	29
2.4.2.3 Sitokin inflamasi	30
2.4.2.4 Sel limfosit T dan imunoglobulin	30
2.4.3 Dosis dan efek toksik timokuinon	31
2.5 Penelitian terdahulu tentang timokuinon	32
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	35
3.1 Kerangka Konseptual.....	35
3.2 Hipotesis Penelitian	37
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	39
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	39
4.2 Populasi dan Sampel	40
4.2.1 Populasi.....	40
4.2.2 Sampel & besar sampel	40
4.2.3 Teknik pengambilan sampel	41
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	42
4.3.1 Variabel bebas.....	42
4.3.2 Variabel terikat	42
4.3.3 Variabel antara.....	42
4.3.4 Variabel kendali	42
4.3.5 Definisi operasional.....	42
4.4 Alat dan Bahan Penelitian	44
4.5 Instrumen Penelitian.....	45
4.6 Prosedur dan Teknis Pengumpulan Data.....	45
4.6.1 Persiapan larutan timokuinon	45
4.6.2 Pemeliharaan tikus putih Wistar	46
4.6.3 Pengukuran <i>Sciatic Functional Index</i> (SFI)	46
4.6.4 Prosedur <i>crush injury</i> saraf isiadikus.....	47
4.6.5 Perlakuan pemberian timokuinon	48
4.6.6 Terminasi hewan & pengambilan sampel.....	50
4.6.7 Pengukuran kadar MMP-9, kadar TNF- α , kadar IL-1 β , kadar IL-10, dan kadar IgG jaringan distal lesi dengan metode ELISA	51
4.6.8 Pengukuran ekspresi NF- κ B dan rasio CD4 ⁺ : CD8 ⁺ dengan metode <i>flow cytometry</i>	52
4.8 Kerangka Operasional	54
4.9 Analisis Data	55
4.9.1 Deskriptif.....	55
4.9.2 Inferensial	56
4.10 Keterangan Kelaikan Etik	56
BAB 5 HASIL PENELITIAN	57
5.1 Karakteristik Sampel Penelitian.....	57
5.2 Uji Normalitas Data Penelitian	57
5.3 Uji Homogenitas Data Penelitian.....	60
5.4 Analisis Deskriptif.....	60
5.5 Pengaruh Pemberian Timokuinon 100 mg/kg terhadap Imunitas.....	67
5.6 Pengaruh Pemberian Timokuinon 250 mg/kg terhadap Imunitas.....	71
5.7 Uji Beda Kelompok Timokuinon 100 mg/kg dan 250 mg/kg	75

5.8	Analisis Jalur Imunitas Alamiah pada Pemberian Timokuinon 100 mg/kg	76
5.9	Analisis Jalur Imunitas Alamiah pada Pemberian Timokuinon 250 mg/kg	77
5.10	Analisis Jalur Imunitas Adaptif pada Pemberian Timokuinon 100 mg/kg	79
5.11	Analisis Jalur Imunitas Adaptif pada Pemberian Timokuinon 250 mg/kg	81
5.12	Perubahan Parameter Imunitas Berdasarkan Waktu	82
BAB 6 PEMBAHASAN		85
6.1	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Ekspresi NF- κ B	85
6.2	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Kadar TNF- α	87
6.3	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Kadar IL-1 β	88
6.4	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Kadar MMP-9	90
6.5	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Kadar IL-10	91
6.6	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Kadar IgG	93
6.7	Pengaruh Pemberian Timokuinon terhadap Rasio CD4 ⁺ : CD8 ⁺ Darah Tepi	95
6.8	Jalur Imunitas Alamiah pada Pemberian Timokuinon	96
6.9	Jalur Imunitas Adaptif pada Pemberian Timokuinon	98
6.10	Temuan Baru Penelitian	101
6.11	Keterbatasan Penelitian	102
BAB 7 PENUTUP		103
7.1	Kesimpulan	103
7.2	Saran	104
Daftar Pustaka		105
Lampiran		113

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Definisi operasional variabel	42
Tabel 5.1	Karakteristik sampel penelitian.....	57
Tabel 5.2	Uji normalitas data tiap kelompok perlakuan	58
Tabel 5.3	Uji normalitas data tiap kelompok waktu	59
Tabel 5.4	Uji <i>Levene</i> dan <i>Box's M</i>	60
Tabel 5.5	Pengaruh pemberian timokuinon 100 mg/kg terhadap imunitas	67
Tabel 5.6	Pengaruh pemberian timokuinon 250 mg/kg terhadap imunitas	72
Tabel 5.7	Uji beda kelompok timokuinon 100 mg/kg dan 250 mg/kg.....	75
Tabel 5.8	Nilai <i>R-square</i> dan <i>communalities</i> jalur imunitas alamiah timokuinon 100 mg/kg.....	77
Tabel 5.9	Nilai <i>R-square</i> dan <i>communalities</i> jalur imunitas alamiah timokuinon 250 mg/kg.....	79
Tabel 5.10	Nilai <i>R-square</i> dan <i>communalities</i> jalur imunitas adaptif timokuinon 100 mg/kg.....	80
Tabel 5.11	Nilai <i>R-square</i> dan <i>communalities</i> jalur imunitas adaptif timokuinon 250 mg/kg.....	82
Tabel 5.12	Perubahan parameter imunitas berdasarkan waktu	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Sel dan sitokin pada degenerasi Wallerian.....	19
Gambar 2.2 Perjalanan waktu sekresi sitokin pada degenerasi Wallerian normal.	20
Gambar 2.3 Efek kerja molekular timokuinon dalam menghambat IRAK-1 yang berperan dalam inhibisi NF- κ B pada makrofag.....	29
Gambar 3.1 Kerangka konseptual.....	35
Gambar 4.1 Rancangan penelitian	39
Gambar 4.2 Penekanan saraf isiadikus di posisi lima milimeter dari ujung <i>forceps</i>	47
Gambar 4.3 Insisi untuk melepaskan saraf isiadikus	50
Gambar 4.4 Sampel jaringan saraf isiadikus tikus yang diambil pada lima milimeter distal lesi	51
Gambar 4.5 Kerangka operasional.....	55
Gambar 5.1 Analisis deskriptif ekspresi NF- κ B	61
Gambar 5.2 Analisis deskriptif kadar TNF- α	62
Gambar 5.3 Analisis deskriptif kadar IL-1 β	63
Gambar 5.4 Analisis deskriptif kadar MMP-9.....	64
Gambar 5.5 Analisis deskriptif kadar IL-10	65
Gambar 5.6 Analisis deskriptif kadar IgG	66
Gambar 5.7 Analisis deskriptif rasio CD4 ⁺ :CD8 ⁺	67
Gambar 5.8 Analisis jalur imunitas alamiah pada pemberian timokuinon 100 mg/kg.....	77
Gambar 5.9 Analisis jalur imunitas alamiah pada pemberian timokuinon 250 mg/kg.....	78
Gambar 5.10 Analisis jalur imunitas adaptif pada pemberian timokuinon 100 mg/kg.....	80
Gambar 5.11 Analisis jalur imunitas adaptif pada pemberian timokuinon 250 mg/kg.....	81
Gambar 6.1 Jalur imunitas alamiah pada pemberian timokuinon 250 mg/kg/hari	98
Gambar 6.2 Jalur imunitas adaptif pada pemberian timokuinon 250 mg/kg/hari.....	100

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Keterangan kelaikan etik	113
Lampiran 2	Deklarasi <i>Conflict of Interest</i>	114
Lampiran 3	Analisa patologi anatomi pemilihan <i>forceps</i> dan titik penjepitan <i>forceps</i>	115
Lampiran 4	Dokumentasi penelitian	116
Lampiran 5	Bahan timokuinon.....	117
Lampiran 6	Tabel berat badan dan <i>Sciatic Functional Index</i> sampel	118
Lampiran 7	Tabel variabel imunitas sampel	122
Lampiran 8	Kurva standar ELISA	126
Lampiran 9	Hasil bacaan <i>flow cytometry</i> NF-kB	129
Lampiran 10	Hasil bacaan <i>flow cytometry</i> CD4 ⁺ :CD8 ⁺	130
Lampiran 11	Artikel jurnal.....	131
Lampiran 12	Penghitungan statistik.....	138

DAFTAR SINGKATAN

Ag	: Antigen
AGP	: <i>Acid Glycoprotein</i>
ALT	: <i>Alanin Aminotransferase</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
APC	: <i>Antigen-Presenting Cells</i>
apoE	: <i>apolipoprotein E</i>
BB	: Berat Badan
BHT	: <i>Butylated Hydroxytoluene</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
C ₅	: <i>Complement component 5</i>
C _{5a}	: <i>Complement component 5 (aktif)</i>
CCL12	: <i>Chemokine C-C Motif Ligand 12</i>
CCL2	: <i>Chemokine C-C Motif Ligand 2</i>
CCL3	: <i>Chemokine C-C Motif Ligand 3</i>
CCR2	: <i>Chemokine C-C Motif Receptor 2</i>
CD3	: <i>Cluster of Differentiation 3</i>
CD4	: <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD40	: <i>Cluster of Differentiation 40</i>
CD47	: <i>Cluster of Differentiation 47</i>
CD63	: <i>Cluster of Differentiation 63</i>
CD68	: <i>Cluster of Differentiation 68</i>
CD8	: <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CL	: <i>Total Clearance</i>
CO ₂	: Karbon Dioksida
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
CPK	: <i>Creatine Phospokinase</i>
CXCL 10	: <i>C-X-C Motif Chemokine 10</i>
CXCR 7	: <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 7</i>
DAMPs	: <i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
g	: gram
GCSF	: <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GPR84	: <i>G-protein-coupled receptor 84</i>
HCl	: <i>Hydrogen Chloride</i>
HD	: <i>Hydro-distillation</i>
HSA	: <i>Human Serum Albumin</i>
HSP60	: <i>Heat Shock Protein 60</i>
HSP70	: <i>Heat Shock Protein 70</i>
IAP	: <i>Integrin Associated Protein</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin G</i>
IgM	: <i>Imunoglobulin M</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-13	: <i>Interleukin-13</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin-1 alfa</i>

IL-1 β	: Interleukin-1 beta
IL-2	: Interleukin-2
IL-23	: Interleukin-23
IL-4	: Interleukin-4
IL-6	: Interleukin-6
iNOS	: <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP-10	: <i>IFN-Gamma Induced Protein 10</i>
IRAK-1	: <i>IL-1 Receptor Associated Kinase-1</i>
IRAK-4	: <i>IL-1 Receptor Associated Kinase-4</i>
IT	: <i>Intermediary Toe Spread</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
kg	: Kilogram
LD-50	: <i>Lethal Dose-50</i>
LDH	: <i>Lactate Dehydrogenase</i>
LIF	: <i>Leukimia Inhibitory Factor</i>
LPC	: <i>Lysophosphatidylcholine</i>
LPS	: Lipopolisakarida
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MBP	: <i>Myelin Basic Protein</i>
MCP-1	: <i>Macrophage Chemoattractant Protein-1</i>
MCP-5	: <i>Monocyte Chemotactic Protein 5</i>
mg	: miligram
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	: mililiter
mm	: milimeter
MMP-2	: <i>Matrix Metalloproteinase-2</i>
MMP-9	: <i>Matrix Metalloproteinase-9</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MyD88	: <i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-KappaB</i>
ng	: nanogram
NS	: <i>Nigella Sativa</i>
p	: probabilitas
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PD ₁	: <i>Programmed Cell Death Protein-1</i>
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
PKA	: <i>Protein Kinase A</i>
PL	: <i>Print Length</i>
PLA ₂	: <i>Phospholipase A₂</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
SDF-1	: <i>Stromal Cell Derived Factor-1</i>
SFE	: <i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SFI	: <i>Sciatic Functional Index</i>
SIRPa	: <i>Signal Regulatory Protein-a</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T $\frac{1}{2}$	: waktu paruh
TLRs	: <i>Toll Like Receptors</i>

TNFR1	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
TNF- α	: <i>Tumor Nekrosis Factor-alpha</i>
TRAF-6	: <i>TNF Receptor Associated Factor-6</i>
TRIF	: <i>TIR-Domain-Containing Adapter Inducing Interferon</i>
TS	: <i>Toe Spread</i>
Vss	: <i>Volume Of Distribution At Steady Stat</i>