

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**TESIS**

**PENINGKATAN KADAR KORTIKOSTERON AKIBAT STRES  
KRONIS TERHADAP EKSPRESI HB-EGF SEBAGAI PENANDA  
GANGGUAN RESEPTIVITAS ENDOMETRIUM  
PADA *Rattus norvegicus***



**RISYA SECHA PRIMINDARI**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI  
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2020**

**TESIS**

**PENINGKATAN KADAR KORTIKOSTERON AKIBAT STRES  
KRONIS TERHADAP EKSPRESI HBEGF SEBAGAI  
PENANDA GANGGUAN RESEPTIVITAS ENDOMETRIUM  
PADA *Rattus norvegicus***



**RISYA SECHA PRIMINDARI  
011714653008**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI  
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

**TESIS**

**PENINGKATAN KADAR KORTIKOSTERON AKIBAT STRES  
KRONIS TERHADAP EKSPRESI HBEGF SEBAGAI  
PENANDA GANGGUAN RESEPTIVITAS ENDOMETRIUM  
PADA *Rattus norvegicus***

**RISYA SECHA PRIMINDARI  
011714653008**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI  
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2020**

**PENINGKATAN KADAR KORTIKOSTERON AKIBAT STRES  
KRONIS TERHADAP EKSPRESI HBEGF SEBAGAI  
PENANDA GANGGUAN RESEPTIVITAS ENDOMETRIUM  
PADA *Rattus norvegicus***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister Kesehatan  
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi  
Pada jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh :

**RISYA SECHA PRIMINDARI  
011714653008**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI  
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2020**

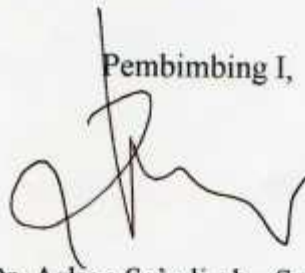
iii

**LEMBAR PENGESAHAN**

Tesis Ini Telah Disahkan  
Pada Tanggal 21 Januari 2020

Oleh :

Pembimbing I,



Dr. Ashon Sa'adi, dr., Sp. OG(K)  
NIP. 19671224 199703 1 003

Pembimbing II



Dr. Reny F'tishom, M.Si  
NIP. 19711023 200212 1 001

Mengetahui,  
Koordinator Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi  
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Dr. Hermanto Tri Joewono, dr., Sp. OG(K)  
NIP. 195601281986031009

**LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI**

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada  
Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister Fakultas Kedokteran  
Universitas Airlangga

Pada Tanggal 20 Januari 2020

Panitia Penguji,

Ketua : Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes

Anggota : 1. Dr. Ashon Sa'adi, dr., Sp.OG (K)

2. Dr. Reny I'tishom, M.Si

3. Dr. Margarita M. Maramis, dr., Sp.KJ (K)

4. Dr. Sri Ratna Dwiningsih, dr., Sp.OG(K)

## PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis berjudul :

Peningkatan Kadar Kortikosteron Akibat Stres Kronis Terhadap Ekspresi HB-EGF  
Sebagai Penanda Gangguan Reseptivitas Endometrium Pada *Rattus norvegicus*

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 20 Desember 2019



RISYA SECHA PRIMINDARI

NIM. 011714653008

## UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, berkat rahmat dan bimbinganNya sehingga usulan penelitian dengan judul “Peningkatan Kadar Kortikosteron Akibat Stres Kronis Terhadap Ekspresi HBEGF Sebagai Penanda Gangguan Reseptivitas Endometrium” dapat diselesaikan. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Kesehatan (M.Kes) pada Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Bersama ini saya ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan.
2. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister.
3. Dr. Hermanto Tri Joewono, dr., Sp.OG (K), selaku Koordinator Program Studi Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan di program studi ini.
4. Dr. Ashon Sa'adi, dr., Sp.OG(K) , selaku Pembimbing I yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang berharga dalam penyusunan tesis ini.



5. Dr. Reny I'tishom, M.Si, selaku Pembimbing II yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang berharga dalam penyusunan tesis ini.
6. Para penguji proposal dan tesis : Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes., Dr. Margarita M. Maramis, dr., Sp.KJ (K), Dr. Sri Ratna Dwiningsih, dr., Sp.OG(K) atas masukan demi keberlangsungan penyusunan tesis ini.
7. Keluarga saya, Ayah (Suwarno S.Pd., M.MPd), Ibu (Srimudayani Dewi Atutik M.Pd.), dan adik Dian Rahmadani yang telah memberikan dukungan moril untuk selalu memacu semangat belajar.
8. Staf sekretariat pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam hal administratif.
9. Staf Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin penggunaan Laboratorium Hewan Coba.
10. Staf Laboratorium Patologi Anatomi Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam pemeriksaan hasil penelitian.
11. Siti Rachmadiani Herlinawati S.Keb., Bd. dan Adde Septiari Rahman S.Keb., Bd., sahabat yang telah berbagi suka, duka dan ilmu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini.
12. Zia Rosyidah S.ST, Yuniar Maharani S.Psi., Alifia Candra Puriastuti S.Keb., Bd., M.Kes., Rona Irlando Krisna, S.IP, sahabat – sahabat yang telah memberikan banyak sekali motivasi, bantuan dan perhatian.
13. Seluruh rekan – rekan mahasiswa Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi angkatan 2017 dan 2016-genap Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

yang merupakan rekan seperjuangan dan telah memberikan dorongan, bantuan dan inspirasi.

Semoga Allah SWT membalas budi baik semua pihak yang telah memberi kesempatan, dukungan, dan bantuan dalam menyelesaikan tesis ini. Saya sadari bahwa tesis ini jauh dari sempurna tapi saya berharap bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, Januari 2020

Penulis

**RINGKASAN**

**PENINGKATAN KADAR KORTIKOSTERON AKIBAT STRES KRONIS  
TERHADAP EKSPRESI HBEGF SEBAGAI PENANDA GANGGUAN  
RESEPTIVITAS ENDOMETRIUM  
PADA *Rattus norvegicus***

**Risya Secha Primindari**

Reseptivitas endometrium adalah keadaan fisiologis di mana endometrium memperoleh fenotip adesif yang memungkinkan implantasi embrio dan terjadi selama periode waktu tertentu yang dikenal sebagai jendela implantasi pada fase *mid-secretory* dari siklus menstruasi. Endometrium manusia mengalami perubahan siklik selama siklus menstruasi sebagai respons terhadap hormon steroid. Tujuan akhir dari perubahan ini adalah untuk mencapai tahap endometrium yang reseptif untuk implantasi embrio.

Stres didefinisikan sebagai mekanisme homeostasis tubuh yang timbul untuk mendukung penyesuaian terhadap rangsangan dari lingkungan yang berpengaruh pada perkembangan dan stimulasi ekspresi yang diinduksi perubahan plastisitas pada fungsi otak dan tingkah laku. Pemberian stres kronis dalam penelitian ini menggunakan metode *Chronic Unpredictable Mild Stress* (CUMS). *Chronic Unpredictable Mild Stress* adalah pemberian berbagai perlakuan sebagai stresor dan menyerupai stresor kehidupan sehari – hari yang tidak terlalu berat namun terus menerus. Stres kronis meningkatkan sintesis dan sekresi glukokortikoid (kortisol pada manusia dan kortikosteron pada hewan pengerat). Peningkatan glukokortikoid adalah biomarker untuk stres dan gangguan depresi, keberadaan kortisol dan kortikosteron pada serum tikus berbeda dan berkorelasi erat dengan dinamika kondisi fisiologis atau stres.

*Heparin Binding Epidermal Growth Factor* (HBEGF) merupakan salah satu biomarker yang turut berperan dalam menentukan reseptivitas endometrium adalah dan termasuk dalam famili *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang berikatan dengan proteoglikan heparan sulfat dan reseptor EGF, yang mempengaruhi interaksi sel ke sel dan merupakan estrogen progesteron dependen. HBEGF diperlukan untuk desidualisasi normal sel-sel stroma endometrium untuk mencapai keadaan reseptif dalam endometrium dan untuk inisiasi implantasi. HBEGF telah diidentifikasi sebagai mediator awal interaksi embrio-uterin selama implantasi dan diekspresikan baik dalam blastokista dan di dalam endometrium selama implantasi serta berperan dalam menstimulasi perkembangan embrio pada saat *hatching*. Tingginya hormon kortisol akibat stres kronis memicu gangguan homeostasis di endometrium oleh karena terhambatnya pembentukan hormon progesteron yang berakibat menurunnya kadar HBEGF.

HBEGF melakukan dua fungsi simultan selama implantasi manusia sebagai faktor perlekatan dan faktor pertumbuhan. Dilaporkan bahwa HBEGF memainkan peran penting dalam persiapan epitel luminal uterus untuk perlekatan blastokista pada awal kehamilan. HBEGF sebagai faktor pertumbuhan berfungsi mempercepat perkembangan embrio manusia ke tahap blastokista dan selanjutnya menetas dari zona pelusida. HBEGF sebagai faktor perlekatan menyebabkan

peningkatan banyak protein penting yang diekspresikan dari permukaan epitel luminal uterus seperti integrin  $\alpha 3$ , *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), dan HOXA10. HBEGF menginduksi proliferasi sel endometrium melalui pengaktifan cascade sinyal ERK1/2 pada sel epitel dan peningkatan sintesis DNA serta *cyclin D3* pada sel stroma (Lim, 2009 ; Strauss, 2014). Menurunnya kadar HBEGF berdampak pada terganggunya proliferasi dan angiogenesis endometrium, hal ini dapat berdampak pada ketidakmampuan endometrium mencapai fase reseptifnya. Sekuensi gangguan proliferasi dan angiogenesis endometrium dapat diartikan terjadinya gangguan pada reseptivitas endometrium.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh peningkatan kadar kortikosteron akibat stres kronis terhadap penurunan ekspresi HBEGF pada *Rattus norvegicus*.

Penelitian ini adalah menggunakan rancangan penelitian *true eksperimental* dengan desain *post test only control group*. Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* betina. Randomisasi dilakukan untuk memasukkan unit sampel ke dalam kelompok 2 kelompok (kontrol negatif dan kelompok perlakuan) dengan jumlah setiap kelompok terdiri dari 17 hewan coba. Sebelum dilakukan paparan stres, setiap hewan coba dilakukan sinkronisasi birahi dengan penyuntikan PGF2 dengan dosis 25  $\mu\text{g/g}$  BB secara intraperitoneal. Tikus pada kelompok kontrol hanya diberikan perawatan rutin yakni pemberian makan dan minum, serta pembersihan kandang. Tikus pada kelompok perlakuan, selain diberikan perawatan rutin juga diberikan perlakuan stres metode CUMS selama 20 hari. Pemeriksaan kadar kortikosteron serum dilakukan menggunakan metode ELISA dan pemeriksaan ekspresi HBEGF pada endometrium menggunakan metode imunohistokimia.

Hasil pemeriksaan kadar hormon kortikosteron pada serum *Rattus norvegicus* pada kelompok kontrol  $23.29 \pm 8.42$  dan kelompok perlakuan  $72.84 \pm 64.03$ . Data dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data. Hasil analisis menunjukkan data berdistribusi tidak normal baik pada kelompok kontrol ( $p=0.024$ ,  $p>0.05$ ) maupun kelompok perlakuan ( $p=0.000$ ,  $p>0.05$ ). Analisis statistik untuk mencari perbedaan dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Mann Whitney* dengan hasil nilai  $p = 0.000$  ( $p<0.05$ ) maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna antara kadar hormon kortikosteron serum *Rattus norvegicus* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Hasil pemeriksaan ekspresi HBEGF endometrium *Rattus norvegicus* setelah 20 hari pemberian stresor pada kelompok kontrol  $118.76 \pm 13.20$  dan kelompok perlakuan  $82.06 \pm 5.91$ . Data dianalisis dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data. Hasil analisis menunjukkan data berdistribusi normal baik pada kelompok kontrol ( $p=0.159$ ,  $p>0.05$ ) maupun pada kelompok perlakuan ( $p=0.077$ ,  $p>0.05$ ). Analisis statistik untuk mencari perbedaan dilanjutkan dengan uji statistik *Independent t-test* menunjukkan  $p=0.000$  ( $p<0.05$ ) yang artinya terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Kesimpulan penelitian ini adalah stres kronis dapat meningkatkan kadar hormon kortikosteron pada serum *Rattus norvegicus*. Peningkatan kadar hormon kortikosteron dapat menurunkan ekspresi HB-EGF pada endometrium *Rattus norvegicus*.

Saran untuk penelitian selanjutnya perlu penelitian lebih mendalam mengenai dampak peningkatan kadar kortikosteron akibat stres kronis dengan menggunakan biomarker reseptivitas endometrium lainnya seperti reseptor HBEGF ErbB4 (HER4) di endometrium, integrin  $\alpha$ 3, LIF, HOXA 10. Apabila dilakukan penelitian yang serupa pada *Rattus norvegicus* atau hewan nokturnal lainnya, maka paparan CUMS sebaiknya dilakukan pada malam hari memperhitungkan siklus sirkadian tikus untuk mendapatkan hasil CUMS yang murni.

**SUMMARY**

**ELEVATED CORTICOSTERONE LEVEL DUE TO CHRONIC STRESS  
ON HB-EGF EXPRESSION AS A MARKER OF ENDOMETRIAL  
RECEPTIVITY DISORDER IN *Rattus norvegicus***

**Risya Secha Primindari**

Endometrial receptivity is a physiological state in which the endometrium obtains an adhesive phenotype that allows embryo implantation and occurs over a period of time known as the implantation window in the mid-secretory phase of the menstrual cycle. The human endometrium undergoes cyclic changes during the menstrual cycle in response to steroid hormones. The ultimate goal of this change is to reach the endometrial stage which is receptive to embryo implantation.

Stress is defined as the mechanism of body homeostasis that arises to support the adjustment of stimuli from the environment that affect the development and stimulation of expression induced changes in plasticity in brain function and behavior. Chronic stress in this study uses the Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) method. Chronic Unpredictable Mild Stress is the giving of various treatments as a stressor and resembles a stressor of daily life that is not too heavy but continuous. Chronic stress increases glucocorticoid synthesis and secretion (cortisol in humans and corticosterone in rodents). Increased glucocorticoids are biomarkers for stress and depressive disorders, the presence of cortisol and corticosterone in rat serums is different and correlates closely with the dynamics of physiological or stress conditions.

Heparin Binding Epidermal Growth Factor (HBEFG) is one of the biomarkers that play a role in determining endometrial receptivity and is part of the family of Epidermal Growth Factor (EGF) that binds to sulfur-induced proteoglycans and EGF receptors, which affect cell-to-cell interactions and are part of the family of Epidermal Growth Factor (EGF) that binds to sulfur-induced proteoglycans and EGF receptors, which affect cell-to-cell interactions and are part of the estrogen progesterone family. dependent. HBEFG is needed for normal decidualization of endometrial stromal cells to reach the receptive state in the endometrium and for the initiation of implantation. HBEFG has been identified as an initial mediator of embryo-uterine interactions during implantation and expressed both in the blastocyst and in the endometrium during implantation and has a role in stimulating embryonic development during hatching. The high cortisol hormone due to chronic stress triggers disruption of homeostasis in the endometrium due to the inhibition of the formation of the hormone progesterone which results in decreased levels of HBEFG.

HBEGF performs two simultaneous functions during human implantation as attachment factors and growth factors. It was reported that HBEGF plays an important role in the preparation of the uterine luminal epithelium for blastocyst attachment in early pregnancy. HBEGF as a growth factor serves to accelerate the development of human embryos to the blastocyst stage and subsequently hatch from the zona pellucida. HBEGF as an attachment factor causes an increase in

many important proteins expressed from the surface of the uterine luminal epithelium such as the  $\alpha 3$  integrin, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), and HOXA10. HBEGF induces endometrial cell proliferation through activation of the ERK 1/2 signal cascade on epithelial cells and increased DNA and cyclin D3 synthesis in stromal cells (Lim, 2009; Strauss, 2014). Decreased levels of HBEGF have an impact on disruption of endometrial proliferation and angiogenesis, this can have an impact on the inability of the endometrium to reach its receptive phase. The sequence of endometrial proliferation and angiogenesis disorders can be interpreted as a disturbance in endometrial receptivity.

This study aims to analyze the effect of elevated corticosterone levels due to chronic stress on decreased HBEGF expression in *Rattus norvegicus*.

This study uses a true experimental research design with a post test only control group design. The subjects used in this study were rats (*Rattus norvegicus*) female Wistar strain. Randomization was carried out to include sample units into groups of 2 groups (negative control and treatment groups) by the number of each group consisting of 17 experimental animals. Before stress exposure was performed, each animal tried to synchronize lust with PGF2 injection at a dose of 25  $\mu\text{g} / \text{g BW}$  intraperitoneally. Rats in the control group were only given routine care, namely feeding and drinking, and cleaning the cage. Rats in the treatment group, besides being given routine care were also given stress treatment for the CUMS method for 20 days. Examination of serum corticosterone levels was carried out using the ELISA method and examination of HBEGF expression in the endometrium using immunohistochemical methods.

The results of examination of corticosterone levels in serum *Rattus norvegicus* in the control group were  $23.29 \pm 8.42$  and the treatment group were  $72.84 \pm 64.03$ . Data were analyzed with the Shapiro-Wilk test to determine the normality of data distribution. The analysis showed that the data were not normally distributed either in the control group ( $p = 0.024$ ,  $p > 0.05$ ) and the treatment group ( $p = 0.000$ ,  $p > 0.05$ ). Statistical analysis to look for differences was followed by Mann Whitney's nonparametric test with the results of  $p = 0,000$  ( $p < 0.05$ ) so it can be concluded that there were significant differences between serum *Rattus norvegicus* serum corticosterone levels in the control group and the treatment group.

The results of examination of *Rattus norvegicus* endometrial HBEGF expression after 20 days of stressor administration in the control group  $118.76 \pm 13.20$  and the treatment group  $82.06 \pm 5.91$ . Data were analyzed with the Shapiro-Wilk test to determine the normality of data distribution. The analysis showed that the data were normally distributed both in the control group ( $p = 0.159$ ,  $p > 0.05$ ) and in the treatment group ( $p = 0.077$ ,  $p > 0.05$ ). Statistical analysis to look for differences continued with the Independent t-test statistical test showed  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) which means that there were significant differences between the control and treatment groups.

The conclusion of this study is that chronic stress can increase corticosterone levels in serum *Rattus norvegicus*. Increased corticosterone levels can reduce the expression of HB-EGF in the endometrium *Rattus norvegicus*.

Suggestions for further research need further research on increasing levels of corticosterone due to chronic stress by using other endometrial receptor biomarkers such as HBEGF ErbB4 receptor (HER4) in the endometrium, integrin

v 3, LIF, HOXA 10. Can be carried out as referred to *Rattus norvegicus* or other nocturnal receptors, then the CUMSpons presentation is done at night to improve the circular rat to get pure CUMS results.