

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI PROTEIN TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta - 1*) dan EKSPRESI PROTEIN p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) PADA KEJADIAN BIBIR SUMBING RAS PROTOMALAYID
PROVINSI NUSA TENGGARA TIMUR**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh :

Erdo Puncak Sidarta

NIM: 105070104121009

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2013

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI PROTEIN TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta - 1*) dan EKSPRESI PROTEIN p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) PADA KEJADIAN BIBIR SUMBING RAS PROTOMALAYID
PROVINSI NUSA TENGGARA TIMUR**

Oleh:

Erdo Puncak Sidarta

NIM: 105070104121009

Telah diuji pada:

Hari: Kamis

Tanggal: 28 November 2013

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D.

NIP. 19670123 199601 1 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

dr.Herman Yosef L. W.,Sp.BP

NIP : 19690408 199803 1 0013

dr. Bambang Soemantri, M.Kes

NIK : 121047564

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr.Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpParK

NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji Syukur senantiasa kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Hubungan Antara Ekspresi Protein TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta - 1*) dan Ekspresi Protein p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Pada Kejadian Bibir Sumbing Ras *Protomelayid* Provinsi Nusa Tenggara Timur”

Penelitian ini bertujuan untuk mencari apakah ada korelasi antara ekspresi protein TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta - 1*) dan ekspresi protein p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) pada kejadian bibir sumbing ras *Protomelayid* provinsi Nusa Tenggara Timur.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. dr. Herman Yosef L.W., Sp.BP sebagai pembimbing pertama yang telah dengan sabar membimbing penulis untuk menulis Tugas Akhir ini dengan baik, serta selalu memberi saran dan memberi masukan terkait penulisan dan pelaksanaan Tugas Akhir.
3. dr. Bambang Soemantri, M.Kes. sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar membimbing penulis menyusun Tugas Akhir ini dengan

baik, serta selalu memberi saran dan masukan terkait parameter dan metode pelaksanaan Tugas Akhir.

4. dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D. sebagai penguji satu yang telah memberikan banyak ilmu dan masukan untuk Tugas Akhir ini sehingga tersusun dengan lebih baik.
5. Bp. Wibi Riawan S.Si, sebagai dosen untuk *sharing* serta rekan belajar penulis
6. Para staff karyawan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Mbak Ami) yang telah membantu penyelesaian proses pengerjaan Tugas Akhir dan memberikan informasi data rekam medis lengkap yang memudahkan penulis.
7. Ayah Yos Sidarta, Ibu Ermina Susantawati, kakak Yona One Sidarta dan Ruth Indah S. yang selalu memberikan kasih dan dukungan dikala penulis dilanda kemalasan.
8. Tim Tugas Akhir FKUB yang setia memberi informasi
9. Teman-teman sepenelitian penulis (Henry, Alex, David, Agnes, Yunita, Prisca, Yesita, Hamrina, Tiara, Dean, Yuri)
10. Segenap warga PD FKUB 2010 khususnya warga PD KBI FKUB 2010, semoga kolegalitas kita tidak terputus.
11. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan segala kritik dan saran yang bersifat membangun.

Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 20 November 2013

Penulis



ABSTRAK

Sidarta, Erdo Puncak. 2013. **Hubungan Antara Ekspresi Protein TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta - 1*) dan Ekspresi Protein p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Pada Kejadian Bibir Sumbing Ras *Protomelayid* Provinsi Nusa Tenggara Timur**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Herman Yosef L.W., Sp.BP., (2) dr. Bambang Soemantri, M.Kes.

Bibir sumbing merupakan kelainan bawaan yang disebabkan oleh banyak faktor. Salah satu faktor penyebabnya adalah faktor genetik. Faktor ini berkaitan dengan protein yang menyebabkan apoptosis sel pada masa intrauterin. Protein TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta - 1*) dan p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) adalah protein yang diketahui memiliki peran yang sinergis dalam proses apoptosis sel dalam masa perkembangan intrauterin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan antara protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing. Penelitian ini menggunakan desain penelitian *cross sectional analytic*. Sampel penelitian adalah jaringan bibir sumbing hasil operasi oleh tim bedah plastik rumah sakit Saiful Anwar Malang pada kegiatan bakti sosial tanggal 3,6,7,8 dan 12 Desember 2012 Di RSU Larantuka, RSU Kupang, RSU Alor Nusa Tenggara Timur yang memenuhi kriteria inklusi eksklusi. Masing-masing jaringan bibir sumbing dilakukan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal TGF- β 1 dan antibodi monoklonal p38 MAPK setelah itu diperiksa dibawah mikroskop dengan menghitung jumlah sel yang mengekspresikan protein tersebut. Analisis korelasi antara protein TGF- β 1 dan p38 MAPK diuji dengan uji *Pearson*. Hasil penelitian menunjukkan hubungan yang bermakna dari ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK dengan koefisien korelasi yang cukup (0,482). Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat hubungan yang positif dan bermakna dengan koefisien korelasi yang cukup kuat antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing ras *Protomelayid* provinsi Nusa Tenggara Timur.

Kata Kunci : protein TGF- β 1, protein p38 MAPK, bibir sumbing

ABSTRACT

Sidarta, Erdo Puncak. 2013. **Correlation Between Expression of Protein TGF- β 1 (Transforming Growth Factor Beta - 1) and Expression of Protein p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) On Protomalayid Race With Cleft Lip in East Nusa Tenggara Province**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Herman Yosef L.W., Sp.BP., (2) dr. Bambang Soemantri, M.Kes.

Cleft lip is a congenital birth defect which caused by many factors. One of those factors is genetic factor which related to the function of protein that causing apoptosis process during intrauterine period. TGF- β 1 (Transforming Growth Factor Beta - 1) and p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) are proteins which regulate apoptosis role during intrauterine period. This research is conducted to understand the correlation between TGF- β 1 protein and p38 MAPK protein on *Protomalayid* people with cleft lip in East Nusa Tenggara. The design of this research is cross sectional analytic. Sample of this research is cleft lip tissue acquired by Saiful Anwar Hospital's plastic surgeon team taken during social event which held on 3,6,7,8 and 12 December 2012 at Hospital of Larantuka, Hospital of Kupang, Hospital of Alor which all located in Nusa Tenggara Timur that fulfill the exclusion and inclusion criteria. Each of the cleft lip tissue is stained with immunohistochemistry staining process using monoclonal antibody TGF- β 1 and monoclonal antibody p38 MAPK then observed under the microscope by counting the cell that expressing the specific protein. Correlation analysis between TGF- β 1 and p38 MAPK is done by Pearson test. The result reveals a significance correlation between TGF- β 1 and p38 MAPK protein expression with moderate coefficient correlation (0,482). The conclusion is TGF- β 1 and p38 MAPK have a significance correlation with moderate coefficient correlation on *Protomalayid* race with cleft lip in East Nusa Tenggara province.

Keywords : protein TGF- β 1, protein p38 MAPK, cleft lip

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Persetujuan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Lampiran	xiv
Daftar Singkatan	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Embriologi Bibir	6
2.2 Bibir Sumbing	7
2.2.1 Definisi	7

2.2.2 Epidemiologi.....	8
2.2.3 Etiologi	8
2.2.4 Patogenesis	10
2.2.5 Patofisiologi	11
2.2.6 Klasifikasi	14
2.2.7 Keadaan Klinis	16
2.3 Protein TGF β -1.....	17
2.3.1 Definisi	17
2.3.2 Pembentukan	20
2.3.3 Aktivasi	21
2.3.4 Sifat Biologis.....	23
2.4 TGF- β 1	23
2.4.1 Definisi	23
2.4.2 Komponen.....	24
2.4.3 Letak	24
2.4.4 Fungsi	25
2.5 p38 MAPK	26
2.5.1 Definisi	26
2.5.2 Struktur.....	26
2.5.3 Aktivasi.....	27
2.5.4 Fungsi	30
2.5.5 Protein p38 MAPK pada Bibir Sumbing	30

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....32

3.1 Kerangka Konsep	32
3.2 Hipotesis Penelitian	33

BAB 4 METODE PENELITIAN.....	34
4.1 Rancangan Penelitian.....	34
4.2 Populasi Sampel.....	34
4.2.1 Subyek	34
4.2.2 Sampel Penelitian	34
4.2.3 Kriteria Inklusi.....	34
4.2.4 Kriteria Eksklusi.....	35
4.2.5 Prosedur Pengambilan Sampel	35
4.2.6 Jumlah Sampel.....	35
4.3 Variabel Penelitian.....	35
4.4 Lokasi Penelitian.....	35
4.5 Waktu Penelitian	36
4.6 Bahan dan Alat/Instrument Penelitian.....	36
4.6.1 Pembuatan Parafin Blok.....	36
4.6.2 Proses Deparafinasi	36
4.6.3 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin.....	36
4.6.4 Proses Imunohistokimia	36
4.6.5 Perhitungan Terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokima dan Histokimia	36
4.7 Definisi/Istilah Operasional	37
4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data	38
4.8.1 Alur Penelitian	38
4.8.2 Pengambilan Jaringan Preparat	39
4.8.3 Pembuatan Sediaan Parafin Blok.....	39
4.8.4 Proses Deparafinasi.....	39

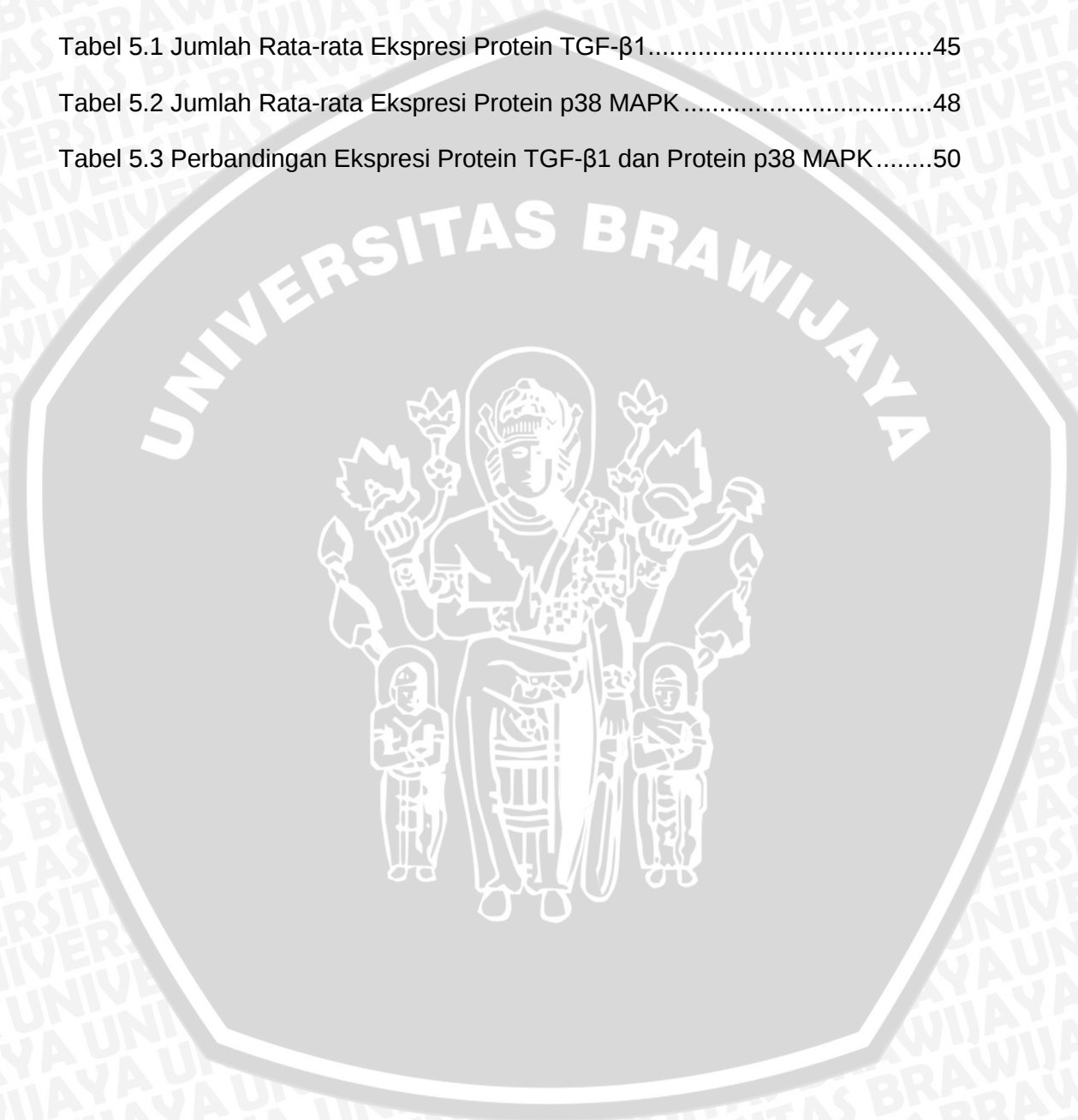
4.8.5 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin.....	39
4.8.6 Proses Imunohistokimia	40
4.8.7 Metode Penghitungan Terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia dan Histokimia	40
4.9 Analisis Data.....	42
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	43
5.1 Pengumpulan Data	43
5.2 Ekspresi Protein TGF β -1	43
5.3 Ekspresi Protein p38 MAPK.....	46
5.4 Analisis Data.....	54
5.4.1 Analisis Data dengan Uji Korelasi <i>Pearson</i>	54
BAB 6 PEMBAHASAN	56
6.1 Ekspresi Protein TGF β -1 pada Sel Epitel Epidermis Jaringan Bibir Sumbing Ras <i>Protomelayid</i>	56
6.2 Ekspresi Protein p38 MAPK pada Sel Epitel Epidermis Jaringan Bibir Sumbing Ras <i>Protomelayid</i>	57
6.3 Hubungan Ekspresi Protein TGF β -1 dan Protein p38 MAPK pada Sel Epitel Epidermis Jaringan Bibir Sumbing Ras <i>Protomelayid</i>	57
BAB 7 PENUTUP	61
7.1 Kesimpulan	61
7.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 : Embriologi Bibir	7
Gambar 2.2 : Perkembangan Bibir dan Palatum	14
Gambar 2.3 : Klasifikasi Bibir Sumbing	16
Gambar 2.4 : Pembentukan TGF β	21
Gambar 2.5 : Jalur Aktivasi TGF- β	23
Gambar 2.6 : Lokasi TGF- β 1	25
Gambar 2.7 : Struktur Protein p38 MAPK	27
Gambar 2.8 : Aktivasi Protein p38 MAPK	30
Gambar 2.9 : <i>Crosstalk</i> Protein p38 MAPK dengan Jalur TGF β	31
Gambar 5.1 : Ekspresi Protein TGF- β 1.....	44
Gambar 5.2 : Grafik Jumlah Ekspresi Protein TGF- β 1	46
Gambar 5.3 : Ekspresi Protein p38 MAPK	47
Gambar 5.4 : Grafik Jumlah Ekspresi Protein p38 MAPK	49
Gambar 5.5 : Ekspresi Protein TGF- β 1 dan p38 MAPK <i>Scatter Plot</i>	51
Gambar 5.6 : Ekspresi Protein TGF- β 1 dan p38 MAPK Diagram Batang.....	52

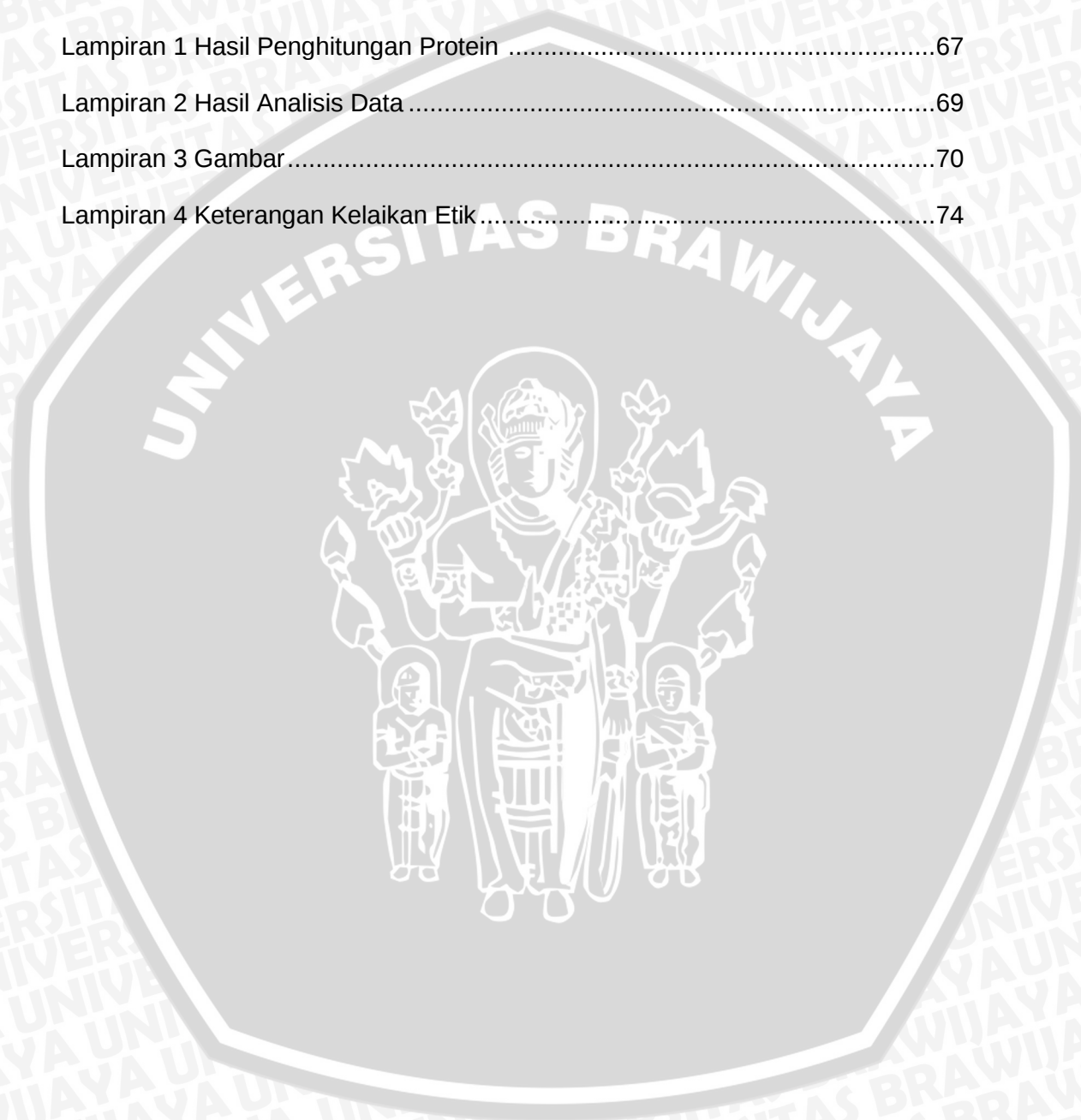
DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Jumlah Rata-rata Ekspresi Protein TGF- β 1.....	45
Tabel 5.2 Jumlah Rata-rata Ekspresi Protein p38 MAPK	48
Tabel 5.3 Perbandingan Ekspresi Protein TGF- β 1 dan Protein p38 MAPK.....	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Penghitungan Protein	67
Lampiran 2 Hasil Analisis Data	69
Lampiran 3 Gambar	70
Lampiran 4 Keterangan Kelaikan Etik	74



DAFTAR SINGKATAN

Akt / PI3K	: (phosphoinositide 3-kinase)
ASK1	: Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	: Adenosine triphosphate
BCL-3	: B-cell leukemia/lymphoma 3
CREB	: cAMP responsive element-binding protein
DLK	: Dual leucine zipper kinase
DLK1	: Dual-leucine-zipper-bearing kinase 1
DNA	: Deoxyribonucleic acid
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
ETC	: Electron transport chain
GPCR	: G-Protein Coupled Receptor
HOX7	: Homeobox gene 7
HSP27	: Small heat shock protein 27
IRF6	: Interferon regularity factor 6
JNK	: Jun N-terminal kinase
LSP1	: Lymphocyte-specific protein 1 (LSP1)
LTBP	: Latent- TGF β binding protein
MAP3Ks	: MAP kinase kinase kinase
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEKK	: MAPK/ERK kinase
MH1	: MAD homology 1
MH2	: MAD homology 2

MKK6	: MAP kinase kinase 6
MKKs	: MAPK kinases
MLK3	: Mixed lineage kinase 3
NF-k B	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	: Nuclear localization signal
P38 MAPK	: P38 Mitogen-activated protein kinase
RAR- α	: Retinoic acid receptor alpha
RNA	: Ribonucleic acid
SRF	: Serum responsive factor
TAK1	: Tgf-beta-activated kinase 1
TAO	: thousand-and-one amino acid
TGF- α	: Transforming Growth Factor Alpha
TGF- β 1	: Transforming growth factor beta 1
TNF	: Tumor necrosis factor
TPL2	: Tumour progression loci 2
TRAF6	: (tumour necrosis factor)-receptor-associated factor
ZAK1	:Leucine zipper and sterile- α motif kinase 1

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Bibir sumbing atau *labioschisis* merupakan penyakit cacat bawaan yang menjadi masalah di kalangan masyarakat, terutama penduduk di negara dengan status ekonomi yang rendah. Bibir sumbing merupakan suatu keadaan di mana terdapat celah pada bibir dikarenakan perkembangan yang tidak sempurna dari bibir dan langit-langit pada masa intrauterin (Nurul, 2008).

Insiden terjadinya bibir sumbing dan celah langit-langit berbeda-beda di setiap tempat, misalnya di Afrika angka kejadiannya 1:3000, Eropa 1:500, Asia 1:350 dan Indian Amerika 1:150 (Stoll, *et. al.*, 2004). Di Asia, angka kejadian bibir sumbing saja tanpa celah langit-langit yaitu 1:500 per 1000 angka kelahiran hidup (Murray, 2002). Di Indonesia sendiri prevalensi bibir sumbing tergolong tinggi, terutama di Provinsi Nusa Tenggara Timur yang memiliki jumlah penderita bibir sumbing tertinggi di Indonesia yaitu 6-9 orang per 1.000 penduduk (Utama, 2012). Kabupaten Timor Tengah Utara dan Kabupaten Timor Tengah Selatan provinsi Nusa Tenggara Timur yang berpenduduk golongan ras *Protomelayid*, memiliki angka kejadian bibir sumbing cukup tinggi yaitu 5 - 6 per 1000 kelahiran hidup, sementara di Pulau Timor, Propinsi Nusa Tenggara Timur berkisar antara 6-9 per 1000 kelahiran hidup (Pardjianto, 2005).

Penyebab terjadinya bibir sumbing ialah multifaktorial, seperti genetik, nutrisi, lingkungan, bahkan sosial ekonomi. Faktor genetik adalah faktor yang paling berperan pada terjadinya bibir sumbing. Menurut Cohen, bibir sumbing

dapat terjadi karena pengaruh faktor genetik dan / atau lingkungan yang menghambat fungsi transkripsi yang selanjutnya berpengaruh pada perkembangan sel *neural crest* sehingga tidak terjadi kontak antara prominensia wajah pada masa intrauterin. Faktor genetik di sini adalah *growth factor* yang menentukan perkembangan embriologis wajah dan daerah mulut. *Growth factor* berperan sebagai regulator proliferasi, diferensiasi, perkembangan, apoptosis, adhesi sel dan sinyal inter- dan intraseluler (Prabhu, *et. al.*, 2012).

Faktor genetik sangat dominan sebagai penyebab terjadinya bibir sumbing pada populasi Nusa Tenggara Timur yaitu ras *Protomelayid*. Hal ini ditunjang dengan bukti bahwa pola hidup yang sama dan tertutup, sehingga banyak terjadi pernikahan dalam keluarga yang dapat berpengaruh terhadap faktor genetik yang diwariskan menjadi semakin besar, sehingga resiko kejadian bibir sumbing semakin tinggi pula (Pardjianto, 2005). Diketahui secara genetik bibir sumbing dapat diwariskan dari orang tua ke anaknya (Prabhu, *et. al.*, 2012)

Perkembangan pada masa intrauterin dipengaruhi oleh protein-protein yang saling mempengaruhi satu sama lain. Protein ini harus bekerja secara seimbang dan tidak boleh ada ekspresi protein yang berlebih atau kurang agar pertumbuhan janin optimal. Beberapa protein berfungsi untuk proses proliferasi sel, dan beberapa protein berfungsi sebagai regulator dan apoptosis sel. Misalnya protein TGF- β 1 , ERK1, AP1.

Pemeriksaan dengan *TUNEL test* menunjukkan adanya proses apoptosis yang terjadi pada bibir sumbing (Krivicka-Uzkurele, *et al.*, 2008). Salah satu protein yang berpengaruh dalam proses apoptosis pada masa intrauterin adalah protein TGF- β 1 (*transforming growth factor beta* - 1). TGF- β 1 adalah protein bagian dari TGF- β superfamili yang terbukti bisa meregulasi banyak proses

selular pada berbagai jenis sel dan jaringan (Wallace dan Hardy, 2005). Beberapa penelitian secara *in vivo* membuktikan bahwa protein ini bekerja sebagai penghambat yang sangat poten pada sel-sel yang sedang berproliferasi sehingga sel tersebut mati (apoptosis) (Moses, 1991). Protein TGF- β 1 yang berfungsi dalam proses apoptosis diaktivasi melalui jalur TGF- β . Namun tingkatan molekuler sangatlah rumit dan saling berhubungan, aktivasi suatu protein dapat mengaktifkan protein lainnya. Demikian pula dengan aktivasi jalur TGF- β dalam proses apoptosis, selain mengaktifkan protein TGF- β 1, jalur ini juga mengaktifkan protein p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Cudrado, 2010). Protein p38 MAPK adalah protein anggota dari MAPK superfamili. Protein ini diaktivasi melalui sitokin inflamasi, faktor pertumbuhan, sinar UV, *oxidative stress*, dan kerusakan DNA yang selanjutnya memiliki efek proliferasi, diferensiasi dan apoptosis pada sel sesuai dengan stimulusnya (Porras dan Guerrero, 2010). Protein TGF- β 1 akan mengaktivasi protein p38 MAPK melalui jalur TGF- β SMAD-independent. Aktivasi protein p38 MAPK melalui jalur ini berdampak pada kegagalan sel dalam proliferasi sehingga sel tersebut mati (apoptosis) khususnya pada daerah *craniofacial* sehingga terjadi defek seperti bibir sumbing (Iwata, *et. al.*, 2012).

Proses apoptosis pada kondisi bibir sumbing berbeda dengan kondisi normal. Protein TGF- β 1 dan p38 MAPK diketahui berfungsi sebagai protein pro-apoptotic. Namun sampai saat ini belum ada penelitian yang menerangkan tentang hubungan kedua protein tersebut pada jalur TGF- β yang berfungsi sebagai agen pro-apoptotic pada kondisi bibir sumbing. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui korelasi ekspresi protein TGF- β 1 dan

ekspresi protein p38 MAPK yang berperan dalam proses apoptosis melalui aktivasi jalur TGF- β pada kejadian bibir sumbing.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini diajukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah ekspresi protein TGF- β 1 pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur?
2. Bagaimanakah ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur?
3. Apakah ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK memiliki hubungan pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur?
4. Bagaimana hubungan antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui korelasi ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui ekspresi protein TGF- β 1 pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur.

2. Untuk mengetahui ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur.

3. Untuk mengetahui hubungan antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur.

4. Untuk mengetahui sifat dari hubungan antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

1. Memberikan data dasar untuk penelitian di bidang kesehatan mengenai ekspresi protein TGF- β 1 pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid*.

2. Memberikan data dasar untuk penelitian di bidang kesehatan mengenai ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid*.

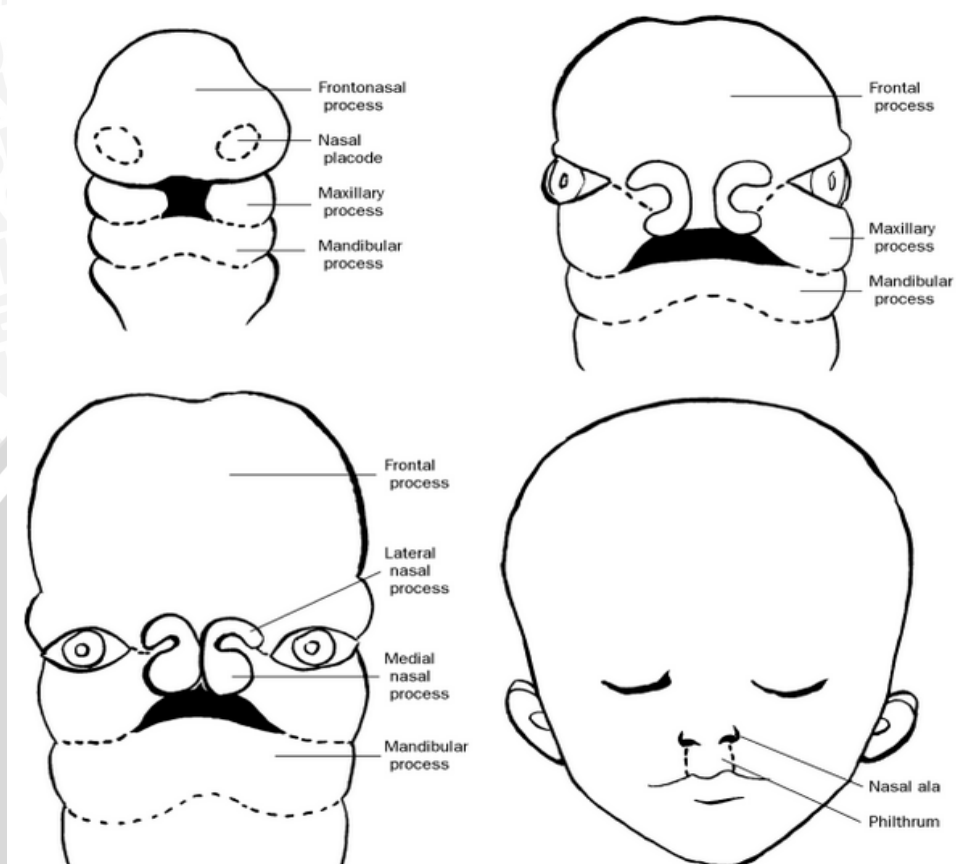
3. Memberikan dasar informasi bagi pengembangan dan penelitian berikutnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Embriologi Bibir

Pada janin berumur 4-6 minggu, di daerah yang membentuk wajah terdapat 5 tonjolan yang mengelilingi *stomatodeum* (mulut) yaitu *processus nasofrontalis* (ditengah dan atas), *processus maksilaris* (tonjolan rahang atas) kanan dan kiri dan *processus mandibularis* (tonjolan rahang bawah kanan kiri). Pada sisi lateral *processus nasofrontalis* sel-sel berproliferasi sehingga membentuk peninggian. Pada minggu ke 5 terjadi suatu *invaginasi* di tengah peninggian itu membentuk *nasal pit* yang akan melindungi lobang hidung. Penonjolan tersebut menjadi *processus nasalis* (tonjolan hidung). Tonjolan hidung ini ada 2 yaitu *processus nasalis medialis* dan *processus nasalis lateralis*. Pada minggu ke 7 terjadi fusi antara *processus maksilaris* dan *processus nasalis medialis*, kemudian adanya penyusupan *masenchym* dan terbentuklah bibir atas. Apabila ada faktor yang menyebabkan fusi atau penyusupan *masenchym* ini tidak terjadi maka terbentuklah celah bibir (Pardjianto, 2005).



Gambar 2.1 : Embriologi Bibir (www.med.umich.edu)

2.2 Bibir Sumbing

2.2.1 Definisi

Bibir sumbing merupakan penyakit kongenital dimana sel-sel pada mulut atau bibir tidak berkembang dengan baik selama perkembangan janin. Secara struktural kelainan ini dapat berupa celah kecil pada bagian bibir yang berwarna sampai pada pemisahan komplit satu atau dua sisi bibir yang memanjang dari bibir ke hidung. Celah pada satu sisi disebut labioschisis unilateral dan jika terdapat celah pada kedua sisi disebut labioschisis bilateral (Bartoskesky 2008.; Thomson 1986.; Sjamsuhidajar, 2005.; Supit & Prasetyono, 2008).

2.2.2 Epidemiologi

Bibir sumbing unilateral adalah jenis bibir sumbing yang sering terjadi (Medscape, 2012). Rasio kejadian bibir sumbing unilateral bagian kiri dan kanan adalah 2:1, dan laki-laki lebih sering 2 kali lipat mengalami bibir sumbing dengan atau tanpa palatum dari pada perempuan (Pedersen, 1996; Soediono, 2009; Dixon, *et. al.*, 2011).

Insiden terjadinya bibir sumbing dan celah langit-langit di Afrika 1:3000, Eropa 1:500, Asia 1:350 dan Indian Amerika 1:150 (Stoll, *et. al.*, 2004). Di Asia, angka kejadian bibir sumbing saja tanpa celah langit-langit yaitu 1:500 per 1000 angka kelahiran hidup (Murray, 2002). Di Indonesia prevalensi bibir sumbing tergolong tinggi terutama di provinsi Nusa Tenggara Timur memiliki jumlah penderita bibir sumbing tertinggi di Indonesia yaitu 6-9 orang per 1.000 penduduk. Kabupaten Timor Tengah Utara dan Kabupaten Timor Tengah Selatan, provinsi Nusa Tenggara Timur yang berpenduduk dari golongan ras *Protomelayid* angka kejadian bibir sumbing cukup tinggi yaitu 5 - 6 per 1000 kelahiran hidup dan di Pulau Timor, Provinsi Nusa Tenggara Timur berkisar antara 6-9 per 1000 kelahiran hidup (Pardjianto, 2005). Didapatkan juga data lain bahwa lebih dari 1000 kejadian bibir sumbing dari 3 juta penduduk pada bayi anak dan dewasa di provinsi nusa tenggara timur (Hidayat, 2006; Utama, 2012).

2.2.3 Etiologi

Bibir sumbing merupakan kelainan bawaan dengan penyebab yang multifaktorial, termasuk kelainan kongenital yang sering dijumpai. Disebut multifaktorial dikarenakan adanya kombinasi dari variasi kecil yang dapat menimbulkan efek yang serius (Thomson, 1986). Menurut Cohen, bibir sumbing dapat terjadi karena pengaruh faktor genetik dan atau lingkungan yang akhirnya

akan menghambat perkembangan sel neural crest atau mengurangi jumlah sel neural crest sehingga menyebabkan kontak antara prominensia wajah tidak terjadi. Perkembangan embriologis wajah dan daerah mulut bergantung pada interaksi berbagai jenis sel dalam berbagai macam faktor meliputi diferensiasi sel, perkembangan, apoptosis, adhesi sel serta sinyal inter- dan intraseluler (Prabhu, *et. al.*, 2012).

Diperlukan pendekatan yang sangat kompleks untuk mengetahui penyebab terjadinya bibir sumbing. Berdasarkan teknologi genetika dan analisis statistik yang terbaru, penelusuran penyebab bibir sumbing karena faktor genetika dan lingkungan dapat menunjukkan hasil (Stainer, 2004).

1. Faktor Lingkungan

Menurut Bronsky *et al.*, faktor lingkungan dapat menghambat *Electron Transport Chain* (ETC) dan menyebabkan hipoksia pada perkembangan prominensia wajah. Faktor lingkungan dapat meningkatkan resiko terjadinya bibir sumbing dan dibagi ke dalam empat kategori besar, yaitu lingkungan intrauterin (trauma pada trimester pertama, daya pembentukan embrio yang menurun, faktor usia ibu, penyakit infeksi, dan stress emosional), lingkungan luar (radiasi), nutrisi dan obat-obatan. Teratogen yang dapat menyebabkan defek pada kelahiran diantaranya adalah anti epilepsi (fenitoin, asam valproat), thalidomid, dioksin (pestisida), asam retinoat, konsumsi alkohol, dan asap rokok (Mansjoer, 2005; Converse, 2006; Prabhu, 2012).

2. Faktor Genetik

Kerusakan pada kromosom dan gen yang berhubungan dengan terjadinya bibir sumbing telah diketahui. Faktor genetika berperan sebagai predisposisi mayor terjadinya bibir sumbing. *Interferon Regulatory Factor 6* (IRF6),

Transforming Growth Factor Alpha (TGF- α), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), *Homeobox Gene* (HOX7), *Retinoic Acid Receptor Alpha* (RAR- α), *B-cell leukemia/lymphoma 3* (BCL-3) adalah gen yang telah diidentifikasi mempunyai peran penting pada terjadinya bibir sumbing. Proses yang terjadi oleh beberapa gen tersebut akan bergabung dan menghasilkan berbagai sinyal molekul, faktor transkripsi, atau hormon pertumbuhan yang mempengaruhi terjadinya bibir sumbing (Stainer, 2004; Moore, 2004; Davidson, 2012; Prabhu, 2012; Barkowitz, 2006).

2.2.4 Patogenesis

Foramen insisif merupakan patokan yang membagi antara celah anterior dan posterior dari bagian anterior ke foramen insisif. Foramen insisif anterior termasuk celah bibir lateral, celah rahang atas, dan celah antara palatum primer dan sekunder. Beberapa defek tersebut disebabkan oleh karena fusi dari prominensia maksilaris yang tidak sempurna ataupun parsial dengan prominensia nasal medial pada satu sisi atau kedua sisinya. Precious menyimpulkan bibir sumbing terjadi ketika tidak adanya kompensasi tubuh saat terjadi gangguan pada waktu proses pembentukan daerah *orofacial*. Hal-hal yang mengganggu tersebut dapat berupa abnormalitas migrasi dari sel *neural crest*, terhambatnya laju pembelahan sel dan/atau kematian sel, kelainan interaksi epitel-mesenkimal, degradasi ekstraselular matriks, ketidakmampuan untuk mengatur diferensiasi sel (Prabhu, *et. al.*, 2012).

Teori patogenesis bibir sumbing (Albery, *et. al.*, 1986) :

1. Teori Fusi

Disebut juga teori klasik. Pada akhir minggu keenam dan awal minggu ketujuh masa kehamilan, prosesus maksilaris berkembang kearah depan

menuju garis median, mendekati prosesus nasomedialis dan kemudian bersatu. Bila terjadi kegagalan fusi antara prosesus maksilaris dengan prosesus nasomedialis maka celah bibir akan terjadi.

2. Teori Penyusupan Mesodermal

Disebut juga teori hambatan perkembangan. Mesoderm tersusun untuk menyebrangi celah, sehingga bibir atas berkembang normal. Bila terjadi kegagalan migrasi mesodermal tersebut maka celah bibir akan terbentuk.

3. Gabungan Teori Fusi dan Penyusupan Mesodermal

Pattern, 1971, pertama kali menggabungkan kemungkinan terjadinya celah bibir, yaitu adanya fusi prosesus maksilaris dan penggabungan kedua prosesus nasomedialis yang kelak akan membentuk bibir bagian tengah.

4. Teori Mesodermal sebagai Kerangka Membran Brankhial

Pada minggu kedua kehamilan, membran brankhial memerlukan jaringan mesodermal yang bermigrasi melalui puncak kepala dan kedua sisi ke arah muka. Bila mesodermal tidak ada maka dalam pertumbuhan embrio membran brankhial akan pecah sehingga akan terbentuk celah bibir

2.2.5 Patofisiologi

Selama minggu ketiga kehamilan, *neural crest* berproliferasi dan bermigrasi ke dalam frontonasal dan bagian *viscera* untuk membentuk lima bentuk primitif yang terdiri dari satu tonjolan frontonasal, dua maksila, dan dua mandibula. Bakal frontonasal terletak di bagian kepala atas dan di hidung. Tonjolan maksila terbentuk bilateral dan terletak di sebelah lateral dari stomatodeum atau bakal dari mulut. Tonjolan mandibula juga terletak bilateral dan bertanggung jawab terhadap pertumbuhan kearah kaudal dari stomodeum (Bender, 2000).

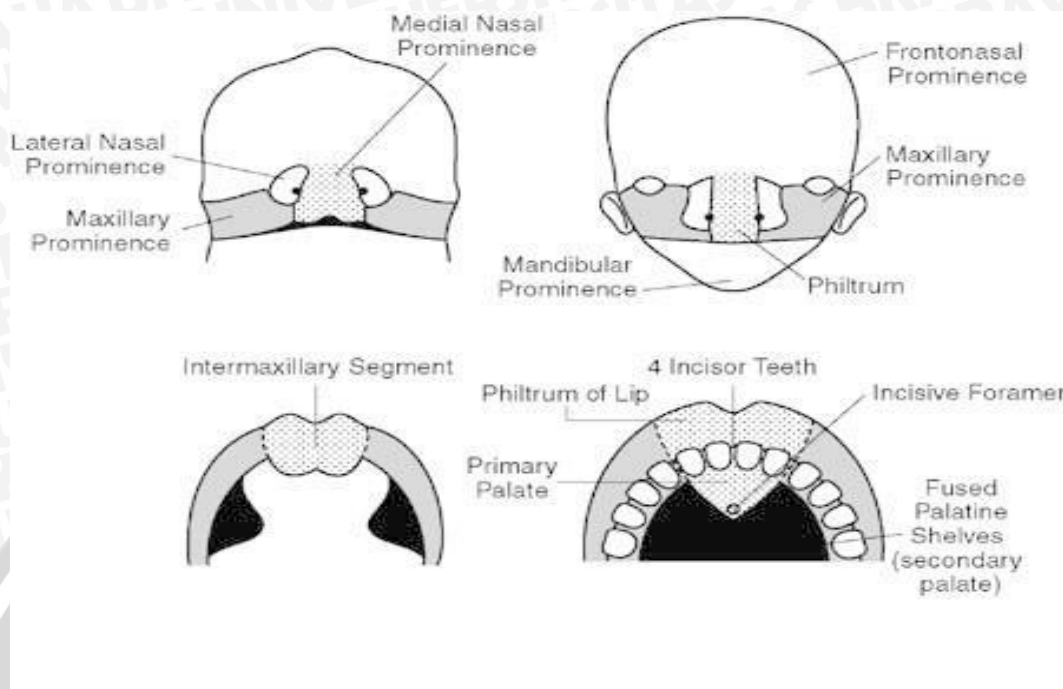
Sel-sel *neural crest* berdiferensiasi ke dalam otot dan jaringan pada wajah, tulang, kartilago, jaringan fibrosa, dan keseluruhan jaringan gigi kecuali email. Selama minggu keempat, bagian medial dari bakal mandibula bergabung membentuk mandibula, bibir bawah, dan area pipi bagian bawah. Kemudian pada akhir minggu keempat muncul bentukan hidung dari bagian frontonasal. Rongga hidung dan bola mata mulai terbentuk dan meluas hingga ke bakal mulut, kemudian menjadi lubang hidung. Pertumbuhan yang cepat akan dilanjutkan hingga minggu keenam dan tujuh, proliferasi cepat dari tonjolan maksila akan menghasilkan bagian medial dari nasal dan bergabung satu sama lain dengan tonjolan lateral dari nasal hingga membentuk area pipi dan hidung. Bibir bagian atas terbentuk selama periode ini oleh pergerakan lateral dari tonjolan maksila dan bagian medial dibentuk oleh fusi antara tonjolan nasal medial (Bender, 2000).

Celah pada bibir merupakan akibat dari kegagalan pembentukan prosesus pada bagian medial dan lateral nasal, serta kegagalan penggabungan dari tonjolan frontonasal dan tonjolan maksila. Celah unilateral terjadi ketika tonjolan maksila gagal bergabung dengan bagian medial dari tonjolan nasal di salah satu sisi. Hal ini menyebabkan jaringan epitel atau kulit tertarik dan rusak sehingga menghasilkan sumbing. Celah bilateral terbentuk dari proses dan hasil yang sama dalam dua alur. Penutupan bibir secara normal terjadi pada minggu kelima dari perkembangan embrio. Beberapa faktor dapat mengganggu perkembangan embrionik wajah yang normal dan menyebabkan terjadinya bibir sumbing (Mansjoer, 2005).

Secara luas bibir sumbing bisa dikelompokkan kedalam komplit atau inkomplit dan juga unilateral dan bilateral. Ciri dari bibir sumbing inkomplit bisa

dilihat dari derajat keragaman pemisahan bibir secara vertikal, mulai dari mukosa sampai cacat otot orbicularis dalam jumlah besar yang masih diluar ambang hidung. Bibir sumbing komplit adalah bibir sumbing yang mengenai seluruh ketebalan bibir dan alveolus dan sering juga diikuti cacat pada langit-langit mulut sekunder (Supit & Prasetyono, 2008).

Bibir sumbing unilateral komplit disebabkan oleh defisiensi dan kesalahan posisi dari jaringan lunak, jaringan tulang yang menyongkong dan struktur kartilago. Ketidakseimbangan dari kekuatan otot normal yang bekerja pada maksila menyebabkan rotasi keluar dari *premaxillar-bearing* segmen medial dan kesalahan posisi posterolateral dari segmen lateral terkecil. Bibir sumbing bilateral komplit adalah hasil dari kegagalan segmen premaksila untuk melakukan fusi dengan segmen maksila lateral. Kelanjutan pertumbuhan premaksila hanya menempel pada vomer atas, menyebabkan proyeksi yang berlebihan pada segmen lateral. Dengan terisolasinya prolabium, kulit menyempit secara vertikal (Jagajan, 2009).



Gambar 2.2 : Perkembangan Bibir dan Palatum (www.studyblue.com)

2.2.6 Klasifikasi

Klasifikasi bibir sumbing berdasarkan pada perkembangan embriologi yang dipengaruhi oleh penyebab dan fisik yang terlibat, yaitu : (Bender, 2000. William, 2009; Prahbu, 2012)

1. *Non-syndromic cleft lip*, tidak terdapat cacat fisik atau gangguan perkembangan kecuali bibir sumbing dan tidak diketahui paparan teratogenik yang dapat menyebabkan terjadinya bibir sumbing
2. *Syndromic cleft lip*, jika pasien memiliki lebih dari satu kelainan yang melibatkan lebih dari satu bidang perkembangan. Dapat disebabkan abnormalitas genetik, sindrom teratogenik, *single genes* disorder dan sindrom celah yang belum diketahui.

Klasifikasi berdasarkan lokasi atau jumlah kelainan, yaitu :

1. Unilateral, sisi kiri lebih sering dari sisi kanan
 - a. Celah satu sisi lengkap (*Complete*), jika celah sumbing yang terjadi hanya

di salah satu bibir dan memanjang hingga ke hidung.

b. Celah satu sisi tidak lengkap (*Incomplete*), jika celah sumbing terjadi hanya disalah satu sisi bibir dan tidak memanjang hingga ke hidung.

2. Bilateral, dapat terjadi pada regio insisif lateral dan kaninus

a. Celah dua sisi lengkap (*Complete*), jika celah sumbing terjadi di kedua sisi bibir dan memanjang hingga ke hidung.

b. Celah dua sisi tidak lengkap (*Incomplete*), jika celah ini terjadi secara inkomplit dimana kedua hidung dan daerah kedua premaksila tidak mengalami pemisahan dan hanya menyertakan dua sisi bibir.

c. Celah dua sisi dengan satu sisi lengkap, sisi yang lain tidak lengkap

Klasifikasi sumbing bibir (Soediono, 2009) :

- Kelas I : Takik unilateral pada tepi merah bibir dan meluas sampai bibir
- Kelas II : Bila takik pada merah bibir sudah meluas ke bibir, tetapi tidak mengenai dasar hidung
- Kelas III : Sumbing unilateral pada merah bibir yang meluas melalui bibir ke dasar hidung
- Kelas IV : Setiap sumbing bilateral pada bibir yang menunjukkan takik tak sempurna atau merupakan sumbing yang sempurna



Sumbing Bibir Tak Lengkap kiri



Sumbing bibir lengkap kiri



Sumbing bibir tak lengkap kanan-kiri



Sumbing bibir -gusi lengkap kanan dan sumbing bibir tidak lengkap kiri

Gambar 2.3 : Klasifikasi Bibir Sumbing (Wihastyoko, 2012)

2.2.7 Keadaan Klinis

Keadaan klinis dari bibir sumbing antara lain : (Garcez, 2005. Rangeth, 2010)

1. Masalah asupan makanan

Asupan makanan merupakan masalah pertama yang terjadi pada penderita bibir sumbing. Adanya bibir sumbing memberikan kesulitan pada bayi untuk melakukan hisapan pada payudara ibu. Reflek hisap dan reflek menelan pada bayi dengan bibir sumbing tidak sebaik pada bayi normal

2. Masalah dental anak

Anak yang lahir dengan bibir sumbing mungkin mempunyai masalah tertentu yang berhubungan dengan kehilangan, malformasi, dan

malposisi dari gigi

3. Masalah telinga anak

Anak dengan bibir sumbing lebih mudah menderita infeksi telinga karena terdapatnya abnormalitas perkembangan dari otot-otot yang mengontrol pembukaan dan penutupan tuba eustachius.

4. Gangguan berbicara

Bayi dengan bibir sumbing juga memiliki abnormalitas pada perkembangan otot-otot palatum mole. Saat palatum mole tidak dapat menutup ruang atau rongga nasal pada saat bicara, maka didapatkan suara dengan kualitas nada yang lebih tinggi atau *hypernasal quality of speech*. Meskipun telah dilakukan reparasi palatum, kemampuan otot-otot tersebut diatas untuk menutup ruang atau rongga nasal pada saat bicara mungkin tidak dapat kembali sepenuhnya normal. Anak mungkin mempunyai kesulitan untuk memproduksi suara atau kata :p, b, d, t, h, k, g, s, sh, and ch", dan terapi bicara atau *speech therapy* biasanya sangat membantu.

2.3 TGF- β

2.3.1 Definisi

Transforming growth factor beta (TGF- β) adalah protein yang disekresikan untuk meregulasi proliferasi, diferensiasi dan kematian dari berbagai jenis sel. Protein ini disekresikan oleh semua jenis sel kekebalan termasuk sel B, sel T, sel dendritik serta makrofag. TGF- β merupakan immunosuppressor utama yang berhubungan dengan autoimun, peradangan dan kanker. TGF- β terdiri dari tiga isoform yakni TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3. Pada kulit ekspresi dari ketiga isoform ini berbeda-beda, dimana TGF- β 1 terekspresi pada stratum korneum dan

stratum granulosum, sedangkan TGF- β 2 dan TGF- β 3 berada pada daerah suprabasal (Gold, *et. al.*, 2000). Dari ketiga isoform ini TGF- β 1 merupakan anggota utama dari golongan sinyal ini yang telah banyak diketahui perannya. TGF- β merupakan superfamili protein yang dikenal sebagai faktor pengatur transformasi beta superfamili, yang meliputi inhibins, aktifin, anti-mullerian hormon, tulang morphogenetic protein, dan decapentaplegik. Kelompok pertama dari superfamili TGF- β adalah kelompok yang memiliki kemampuan untuk mengekspresikan fenotip dan mengubah ekspresi sel-sel dalam kultur. Selain diketahui memiliki spektrum efek yang luar biasa pada pertumbuhan dan perkembangan sel normal faktor pertumbuhan yang disekresi ini juga merangsang produksi sel-molekul adhesi, faktor pertumbuhan lainnya, dan molekul matriks ekstraselular. Ketiga anggota keluarga TGF- β memiliki struktur peptida yang sangat mirip, ketiga-tiganya disandikan sebagai prekursor protein. TGF- β 1 mengandung 390 asam amino, sedangkan TGF- β 2 dan TGF- β 3 masing-masing mengandung 412 asam amino. Semua TGF- β memiliki terminal N-peptida yang terdiri dari 20-30 asam amino yang berguna untuk mengatur sekresi sel pada sel target. TGF- β juga memiliki terminal C yang terdiri dari 112-114 asam amino yang berperan sebagai signal pembentukan TGF- β itu sendiri. TGF- β yang matang membentuk protein dimer untuk menghasilkan molekul 25 kDa aktif dengan struktur yang mempunyai banyak motif. TGF- β mempunyai sembilan residu sistein dimana delapan residu sistein membentuk ikatan disulfida dalam molekul untuk membentuk karakteristik struktur simpul sistein dari TGF- β superfamili dan sistein kesembilan dimanfaatkan untuk membentuk sebuah ikatan dengan model dimer. Banyak residu pada TGF- β yang berfungsi untuk membentuk struktur sekunder melalui interaksi hidrofobik. Daerah sistein pada

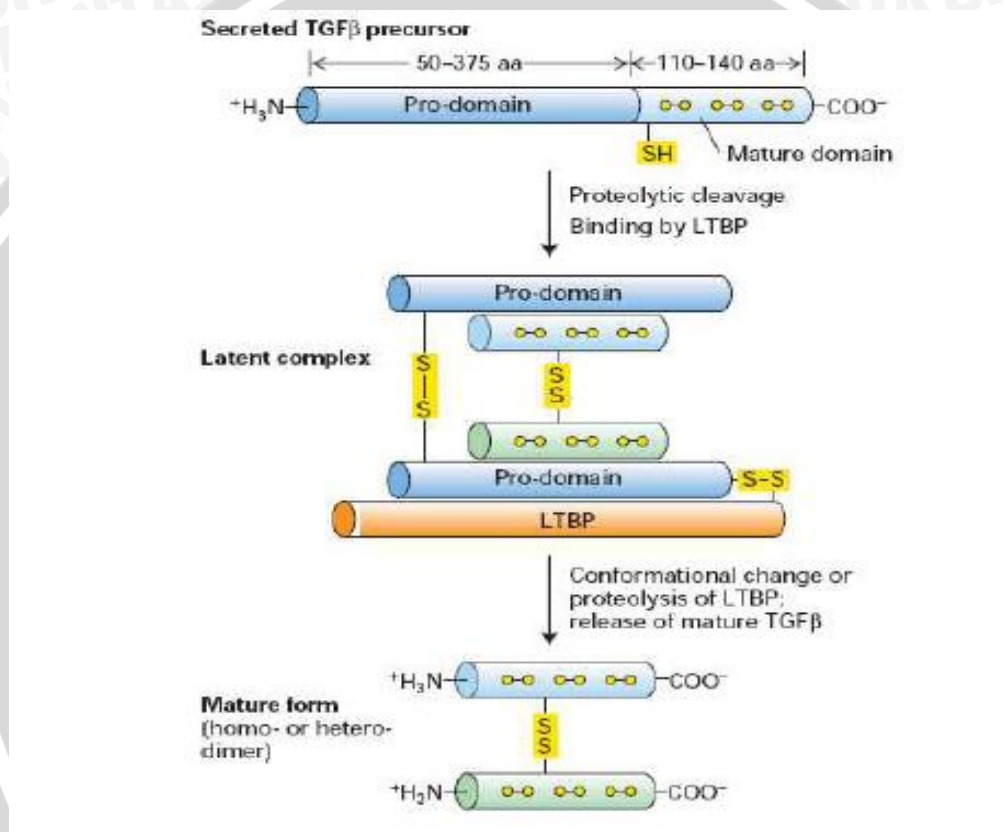
posisi antara kelima dan keenam merupakan daerah yang paling berbeda dari molekul TGF- β yang ditampilkan pada permukaan molekul dan terlibat dalam pengikatan reseptor. Anggota superfamili TGF- β berasal dari prekursor protein aktif disekresi melalui proses proteolitik. Prekursor mengandung N-terminal peptida, sebuah pusat prodomain yang mengandung 50-375 asam amino, dan C-terminal matang domain, yang membentuk faktor pertumbuhan aktif. Bentuk monomer faktor pertumbuhan ini mengandung 110-140 asam amino dan memiliki struktur kompak dengan empat antiparalel helai dan tiga β disulfida intramolekul yang membentuk struktur yang terikat kuat yang disebut simpul sistin. Simpul domain sistein relatif tahan terhadap denaturasi, sehingga memungkinkan perannya sebagai molekul ekstraselular. Sebagian besar di antara berbagai variasi urutan protein TGF- β diamati di daerah N-terminal, loop bergabung dengan β untai, dan α heliks. Tambahan N-terminal sistein pada masing-masing monomer TGF- β menyebabkan terjadinya homodimers dan heterodimers fungsional. Kombinasi heterodimer yang berbeda dapat meningkatkan keragaman fungsional protein ini di luar yang dihasilkan oleh perbedaan dalam urutan utama dari monomer. Urutan utama monomer TGF- β kurang dari 10 persen homologi dengan faktor pertumbuhan saraf dan trombosit yang diturunkan dari faktor pertumbuhan ini menunjukkan asal usul yang sama dengan banyak sekuens selama evolusi, ketiga faktor pertumbuhan memiliki perbedaan dalam organisasi dari subunit N dalam protein dimer. Ikatan silang iodinated molekul TGF- β berada pada permukaan sel dan telah diketahui tiga polipeptida dengan berat molekul jelas 55, 85, dan 280 kDa, dan dari berat molekul ini maka disebut sebagai reseptor TGF- β I, II, dan III. Reseptor TGF- β tipe I dan tipe II keduanya merupakan protein transmembran serin atau treonin kinase.

Pengikatan TGF- β terdiri dari reseptor tipe I dan tipe II, yang akan menginduksi pembentukan reseptor multimerik yang sebagian besar adalah heterotetramer. Gen TGFB-1(*transforming growth factor beta 1*), gen ini menghasilkan sinyal untuk memproduksi protein *transforming growth factor beta-1* (TGF- β 1). Protein ini membantu dalam mengontrol pertumbuhan dan proliferasi sel, dengan cara differensiasi, motilitas, dan apoptosis. TGFB-1 didapatkan diseluruh tubuh dan berperan saat perkembangan sebelum kelahiran, pembentukan pembuluh darah, regulasi jaringan otot, dan perkembangan lemak tubuh, penyembuhan luka dan sistem imun tubuh. TGFB-1 berlimpah didalam jaringan yang membentuk rangka, dimana itu membantu pertumbuhan tulang, dan didalam *intricate lattice* yang membentuk ruang antar sel (ekstraselular matriks). Saat didalam sel, protein ini dalam bentuk tidak aktif sampai dia menerima signal kimiawi untuk menjadi aktif (Rifa'i, 2009).

2.3.2 Pembentukan

Sejumlah molekul pembawa sinyal ekstraseluler yang berperan dalam meregulasi perkembangan, baik pada vertebrata maupun invertebrata, merupakan superfamili *transforming growth factor β* (TGF- β). TGF- β manusia tersusun atas tiga isoform protein, yaitu TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3. Masing-masing isoform TGF- β disintesis sebagai bagian prekursor yang mengandung pro-domain. Domain tersebut dipotong, tetapi masih berasosiasi secara nonkovalen dengan domain mature setelah protein disekresikan. Kebanyakan TGF- β yang disekresikan disimpan dalam matriks ekstraseluler sebagai laten, yaitu kompleks inaktif yang mengandung prekursor TGF- β dan berikatan kovalen dengan *TGF β -binding protein* yang disebut *Latent- TGF β Binding Protein* (LTBP). Pengikatan LTBP oleh protein matriks thrombospondin atau cell-surface integrin

memicu perubahan konformasi LTBP yang menyebabkan pelepasan TGF- β dimer yang aktif. Alternatif lainnya adalah pemutusan ikatan protein dengan matriks metaloprotease yang juga menghasilkan aktivasi TGF- β . Proses pembentukan TGF- β ditunjukkan dalam gambar (Rifa'i, 2009)



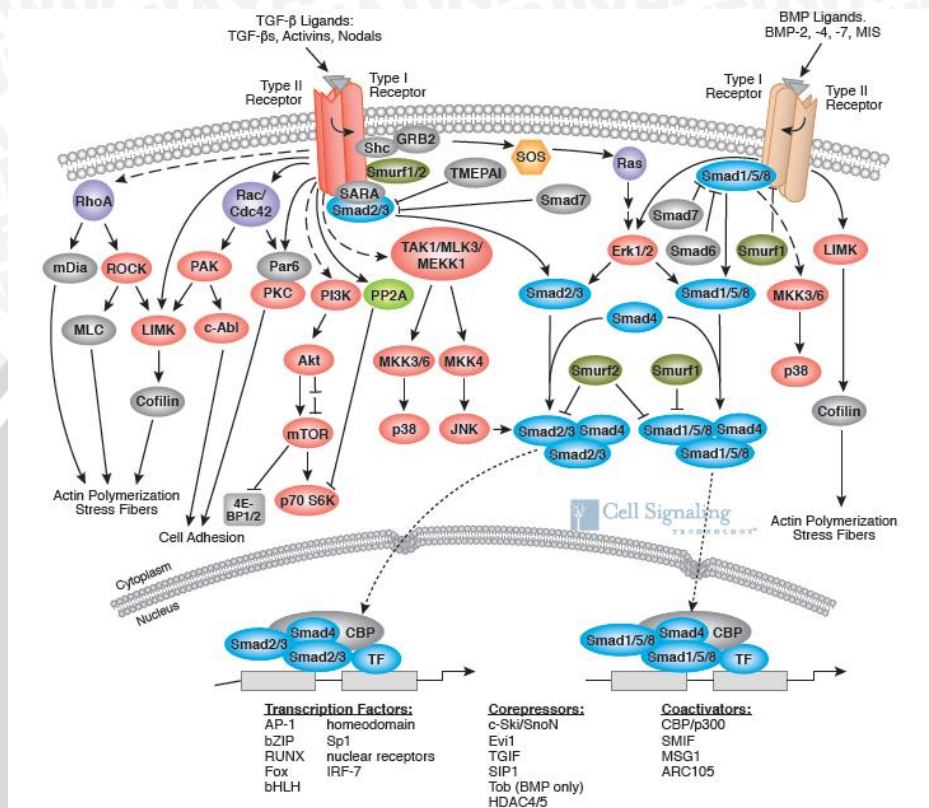
Gambar 2.4 : Pembentukan TGF- β (Rifa'i, 2009)

2.3.3 Aktivasi

Smad adalah faktor transkripsi *downstream* dari TGF- β . Terdapat tiga jenis protein Smad yang berperan dalam jalur *TGF- β -signaling* yaitu *receptor-regulated Smads* (R-Smads), *co-Smads*, dan *inhibitory* atau *antagonistic Smads* (I-Smads). R-Smad mengandung dua domain, yaitu MH1 dan MH2, yang dipisahkan oleh *flexible linker region*. N-terminus dari domain MH1 mengandung bagian yang mengikat DNA spesifik (*specific DNA-binding segment*) dan sebuah

sekuens yang disebut *nuclearlocalization signal* (NLS) yang dibutuhkan untuk transpot protein menuju nukleus. Pada saat R-Smad dalam keadaan inaktif (tidak terfosforilasi), NLS dalam keadaan menutup (*masked*), dan domain MH1 dan MH2 berasosiasi sehingga tidak dapat berikatan dengan DNA atau co-Smad maka fosforilasi pada tiga residu serine di dekat C-terminus dari R-Smad (Smad2 atau Smad3) oleh reseptor TGF- β tipe I yang teraktivasi akan memisahkan dua domain tersebut dan memberikan ikatan antara importin β dengan NLS. Selanjutnya sebuah kompleks yang mengandung dua molekul Smad3 (atau Smad2) dan satu molekul co-Smad terbentuk dalam sitosol. Kompleks ini distabilkan oleh ikatan dua serine yang terfosforilasi pada masing-masing Smad3 dengan phosphoserine-binding site pada domain Smad3 dan MH2 Smad4. Pengikatan importin β kemudian memediasi translokasi kompleks heterodimer R-Smad/co-Smad ke dalam nukleus yang selanjutnya terdisosiasi di dalam nukleus, dan kompleks Smad2/Smad4 atau Smad3/Smad4 bersama-sama dengan faktor transkripsi mengaktifkan transkripsi pada gen target yang spesifik. Saat berada di dalam nukleus, R-Smad kemudian mengalami defosforilasi menghasilkan disosiasi kompleks R-Smad/co-Smad dan kedua Smad keluar dari nukleus karena *shuttling* nucleocytoplasmic dari Smad, konsentrasi Smad aktif di dalam nukleus menggambarkan tingginya reseptor TGF- β yang teraktivasi pada permukaan sel. Seluruh sel mamalia mensekresikan sekurang-kurangnya satu isoform TGF- β , dan umumnya memiliki reseptor TGF- β pada permukaannya. Adanya variasi respon jenis-jenis sel tertentu oleh TGF- β dikarenakan tiap sel mengandung faktor transkripsi yang berbeda. Pada sel epitel dan fibroblas misalnya, TGF- β tidak hanya menginduksi ekspresi protein matriks ekstraseluler

(misalnya kolagen), tetapi juga ekspresi protein yang menghambat serum protease (Rifa'i, 2009).



Gambar 2.5 : Jalur Aktivasi TGF- β (www.cellsignal.com)

2.3.4 Sifat Biologis

Ada beberapa sifat biologis TGF- β antara lain menurut Wallace dan Hardy (2005) adalah :

1. Inhibisi siklus sel
2. Proses perbaikan dan inflamasi
3. Angiogenesis
4. Patogenesis kanker

2.4 TGF- β 1

2.4.1 Definisi

Sinonim :DPD1; LAP; *Latency-associated peptide*; TGF-beta 1 protein; TGF-beta-1; TGFB; TGFB1; TGFbeta; *Transforming growth factor beta-1*.

Gen simbol : TGFB1

Berat molekul : 44.341 Da

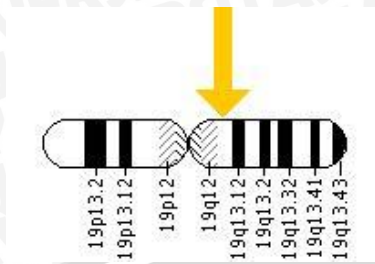
Gen TGFB1 menghasilkan protein TGF- β 1 yang merupakan bagian dari TGF- β superfamili yang merupakan protein multifungsional yang mengatur proliferasi, diferensiasi, apoptosis dan fungsi lainnya dalam masa perkembangan sebelum lahir. Banyak sel mensintesis TGF- β 1 dan juga memiliki reseptor spesifik untuk TGF- β 1. Protein ini secara positif dan negatif juga berfungsi untuk meregulasi faktor pertumbuhan lain (Hornbeck, *et. al.*, 2011 ; U.S. National Library of Medicine, 2012).

2.4.2 Komponen

TGF- β 1 terdiri dari beberapa komponen yaitu, *proteinaceous* ekstraselular matriks, rongga ekstraselular, permukaan sel, soma sel, axon, lumen golgi, sitoplasma, rongga ekstraselular, nukleus, granul pensekresi (Hornbeck, *et. al.*, 2011).

2.4.3 Letak

Letak dari gen TGF- β 1 berada pada lengan panjang (q) dari kromosom 19 pada posisi 13.1. Lebih spesifiknya gen ini terletak dari *base pair* 41,836,811 hingga *base pair* 41,859,830 pada kromosom 19 (U.S. National Library of Medicine, 2012).



Gambar 2.6 : Lokasi TGF- β 1 (U.S. National Library of Medicine,2012)

2.4.4 Fungsi

Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) adalah sebuah contoh dari suatu keluarga polipeptida yang berperan dalam mengontrol pertumbuhan, produksi ekstra selular matriks, perkembangan, pembentukan jaringan dan apoptosis. Studi secara *in vivo* membuktikan bahwa efek TGF- β 1 sangat dominan sebagai inhibitor pada proliferasi yang mengakibatkan sel tersebut apoptosis (Moses, 1991).

Protein TGF- β 1 memiliki peran ganda dalam proses apoptosis, interaksi dan keseimbangan dari stimulus yang berbeda menyebabkan TGF- β 1 bisa berperan sebagai pro- atau anti-apoptotic. Sebagai agen pro-apoptotik, TGF- β 1 bekerja pada reseptor Fas, TNF, dengan modulator apoptotic intrasel yaitu JNK dan p38 MAP kinase, Akt, NF-kappaB, dan juga dengan jalur apoptotic mitokondria yang dimediasi oleh famili Bcl-2 (Sanchez, 2005).

Ada dua jalur aktivasi protein TGF- β 1 dalam fungsinya sebagai agen pro-apoptosis yang pertama dinamakan jalur TGF- β SMAD-*dependent* dimana aktivasi protein TGF- β 1 akan mempengaruhi protein SMAD yang kemudian akan mengaktifkan protein-protein lain yang berakhir pada proses apoptosis sel. Jalur ke dua yaitu TGF- β SMAD-*independent*, jalur ini tidak diperantarai protein SMAD melainkan protein TGF- β 1 secara langsung mengaktifasi protein p38 MAPK

yang selanjutnya akan mempengaruhi faktor transkripsi gen sehingga mengakibatkan apoptosis sel (Wang, 2002).

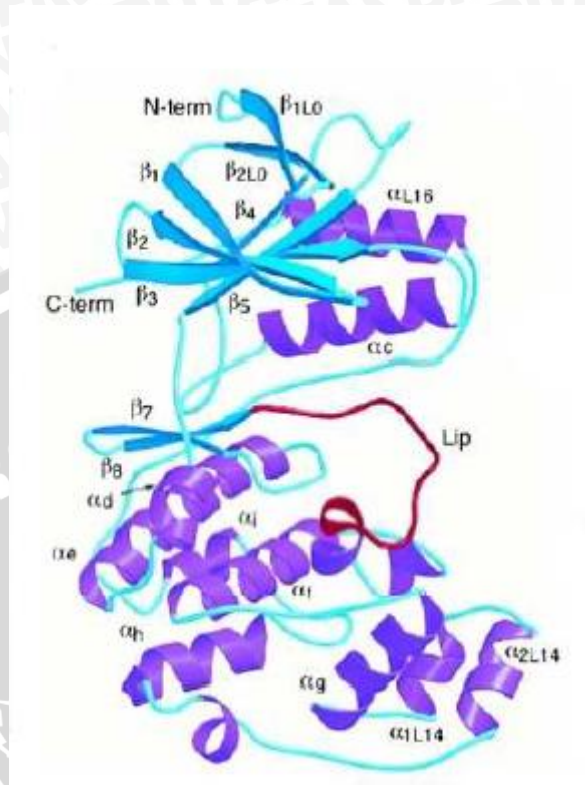
2.5 p38 MAPK

2.5.1 Definisi

Protein p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) adalah famili dari serine/threonine protein kinase yang berperan penting dalam respon selular oleh eksternal signaling. Protein ini juga berfungsi dalam proses selular seperti inflamasi, diferensiasi sel, pertumbuhan sel, dan apoptosis. Protein p38 MAPK terdiri dari 4 isoform yaitu p38 α , β , γ , dan δ (Kumphune S., 2011). Proses selular distimulasi *growth factor*, *cytokines*, dan GPCR (G-Protein Coupled Receptor)(Cuadrado,2010).

2.5.2 Struktur

Protein p38 MAPK 48% identik dengan asam amino pada ERK2. Enzyme pada famili MAPK memiliki 2 domain yang dipisahkan celah dimana substrat potensial dapat berikatan. Domain N-Terminal membentuk ikatan pada cincin ATP, dan domain C-Terminal berisi *magnesium binding site*. (Keith P, *et al.*, 1996).



Gambar 2.7 : Struktur Protein p38 MAPK (Kumphune S,2011)

2.5.3 Aktivasi

Seperti pada protein kinase lainnya, aktivasi p38 mapk memerlukan fosforilasi. P38 mapk diaktivasi oleh fosforilasi ganda dari sekuens Thr-Gly-Tyr. Dengan adanya stimulus yang tepat, threonin dan tirosin residu bisa di fosforilasikan oleh tiga spesifitas-ganda MKKs/MAP2Ks. MKK6 bisa memfosforilasi 4 anggota dari famili p38.

Aktivasi p38 berasal dari berbagai rangsangan yang dapat diamati oleh beragam MAP kinase kinase kinase (MAP3Ks), termasuk TAK1, ASK1/MAPKKK5, DLK/ MUK /zpk MEKK4. Ada dua MKKS utama yang mengaktivasi p38, MKK3 dan MKK6. MKK diinduksi fosforilasi ganda p38 pada

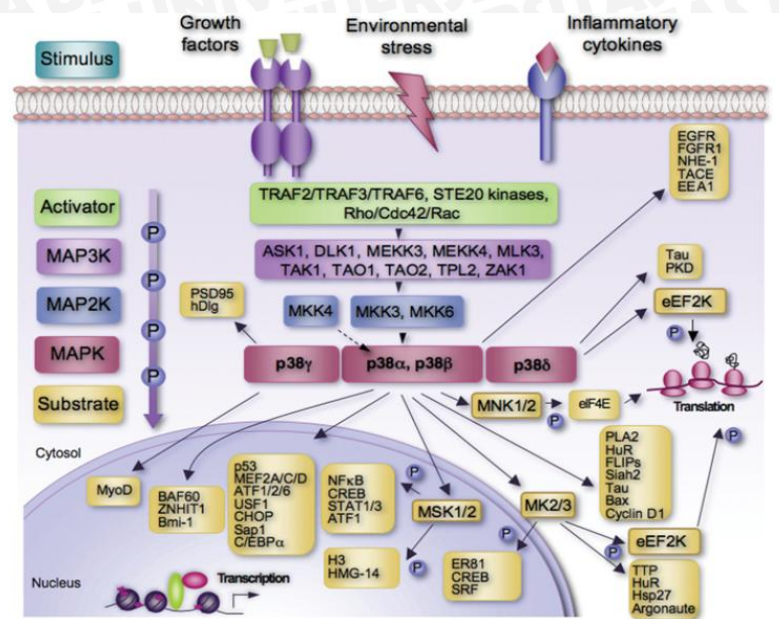
Thr180 dan Tyr182 yang menyebabkan aktivasi loop untuk *refold* dan keluar dari saluran ikatan peptida. Gerakan ini kemudian mengakibatkan efek *crank-handle*.

Pada semua struktur tersier, yang memungkinkan kerjasama untuk mengikat ATP. Ketika p38 MAPK berada dalam fosforilasi non-dual, konformasi inaktif, *loop* akan berada di celah ikatan peptida yang terletak diantara amino- dan *carboxy-terminal lobe* dari kinase. Selain itu, di p38 MAPK berkebalikan dengan p42/44-MAPK, didapatkan ketidaksesuaian lobus, yang mecegah kerjasama antara Lys53, di lobus N-terminal, dan Asp168, di lobus C-terminal, hal ini penting untuk pengikatan dan stabilisasi α -phosphate dari kelompok dan ribosa yang berdekatan dengan ATP. Oleh karena itu secara luas dianggap bahwa fosforilasi non dual dari p38 tidak aktif karena hambatan dari ikatan peptida dan afinitas ATP yang rendah.

Setelah fosforilasi ganda p38 MAPK, bentuk aktif p38 MAPK dapat mengakses ke ATP menggunakan aktivitas kinase untuk memfosforilasi *down regulation*. MAPKs memiliki preferensi substrat, tapi bukan persyaratan mutlak, untuk situs yang mengandung serin atau treonin akan diikuti residu prolin. Ada 2 jenis substrat *downstream* dari p38 MAPK termasuk protein kinase dan faktor transkripsi. MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP-K2 or M2) adalah substrat pertama yang teridentifikasi. Substrat ini memiliki aktivitas kinase pada dirinya sendiri dan terbukti memfosforilasi banyak substrat termasuk *small heat shock protein 27* (HSP27), *lymphocyte-specific protein 1* (LSP1), *cAMP responsive element-binding protein* (CREB), *Serum Responsive Factor* (SRF) dan *tyrosine hydroxylase* (Kumphone S, 2011).

MAP3Ks (MAP2K kinase) telah terbukti memicu p38. Aktivasi MAPK, termasuk ASK (*apoptosis signal regulating kinase-1*), DLK1 (*dual-leucine-zipper*

bearing kinase 1) , [TGF (transforming growth factor) β -activated kinase1] TAO (thousand-and-one amino acid) 1 dan 2, TPL2 (tumour progression loci 2), MLK3 (mixed lineage kinase 3), MEKK (MAPK/ERK kinase) 3 dan MEKK4, dan ZAK1(leucine zipper and sterile- α motif kinase 1). Beberapa MAP3Ks yang memicu p38 MAPK juga dapat mengaktifkan jalur JNK. Keragaman MAP3Ks dan mekanisme regulasinya memungkinkan MAP3Ks merespon dari banyak stimuli untuk mengaktifasi p38 MAPK dengan jalur aktivasi lain. MAP3Ks kadang memiliki hubungan yang dengan stimuli tertentu. Contohnya ASK1 memegang peranan dalam aktivasi p38 MAPK oleh stress oksidatif. Mekanismenya mencakup dimerisasi dari ASK1 dan autofosforilasi, yang memfasilitasi lepasnya ASK1-binding protein seperti thioredoxin. TRAF6 ((tumour necrosis factor)-receptor-associated factor) diperlukan untuk mengaktifkan p38 MAPK oleh reseptor TGF- β . TRAF6 berinteraksi dengan reseptor TGF- β kemudian terjadi *auto-ubiquitination* dari TRAF6, lalu mengaktifasi TAK1. TRAF6 meregulasi dari aktivasi TAK1 pada jalur Smad kanonik dan aktivitas kinase pada TGF- β reseptor. Perlu diingat bahwa TAK1 juga merupakan aktivator penting jalur NF- κ B anti-apoptotic. Ini mengilustrasikan bagaimana aktivitas MAP3K diperlukan untuk menjalankan mekanisme regulasi, dimana bisa memfasilitasi signal *fine-tuning* dan *cross-talk* dengan jalur aktivasi lain (Cudrado, 2010).



Gambar 2.8 : Aktivasi Protein p38 MAPK (Cuadrado,2010)

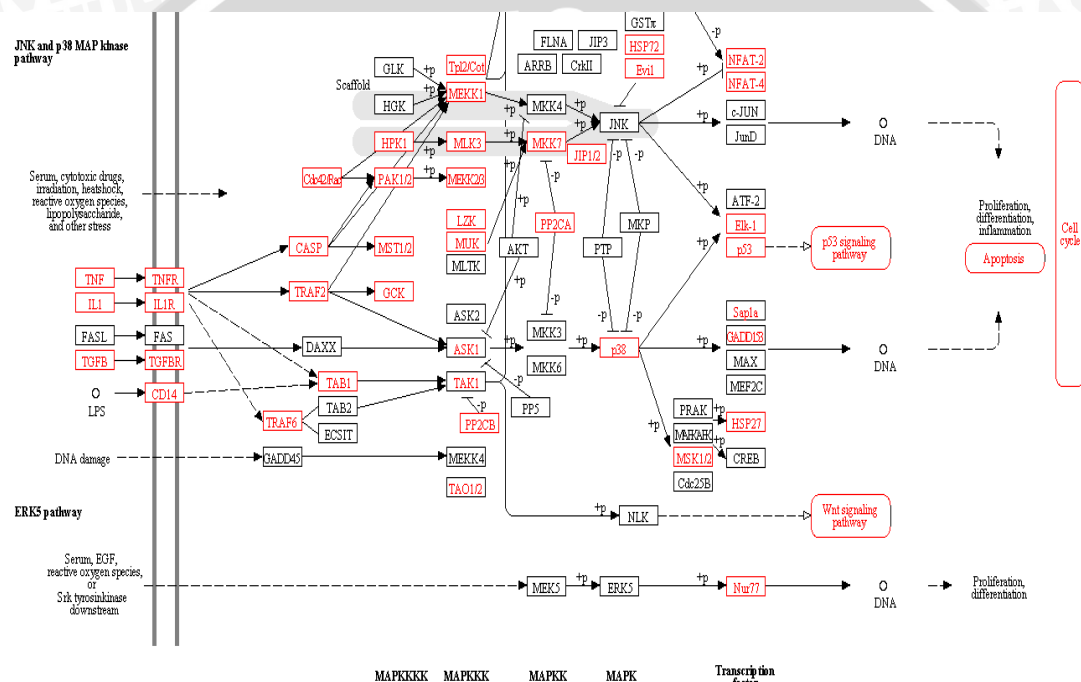
2.5.4 Fungsi

Fungsi dasar dari protein ini sangat beragam, mulai dari sebagai faktor transkripsi dan regulator dari remodelling kromatin, dan cytosolic protein yang meregulasi proses seperti protein degradasi dan lokalisasi, stabilitas mRNA, endocytosis, apoptosis, sitoskeleton dinamik atau migrasi sel (Cuadrado, 2010).

2.5.5 Protein p38 MAPK pada Bibir Sumbing

Protein p38 MAPK memiliki peran dalam memediasi *signalling* dari TGF- β melalui jalur *SMAD-independent* yang bertanggung jawab dalam meregulasi sel khususnya pada perkembangan wajah dan tengkorak. Aktivasi p38 MAPK akan mengganggu sel pada masa perkembangan dibuktikan dengan adanya penelitian yang menyatakan bahwa peningkatan aktivasi dari p38 MAPK bisa digunakan sebagai penanda akan perkembangan yang tidak sempurna pada daerah wajah dan tengkorak. Mekanisme ini dimulai pada saat aktivasi jalur TGF- β yang tidak normal tanpa melalui jalur SMAD memicu kaskade TAK1-ASK1

yang kemudian akan mengaktifkan protein p38 MAPK dan memberikan respon untuk menghambat proliferasi sel sehingga sel tersebut mati (apoptosis) khususnya pada daerah wajah dan tengkorak. Banyaknya protein p38 MAPK dapat menyebabkan seseorang mengalami defek pada wajah dan tengkorak seperti bibir sumbing (Iwata, *et. al.*, 2012).

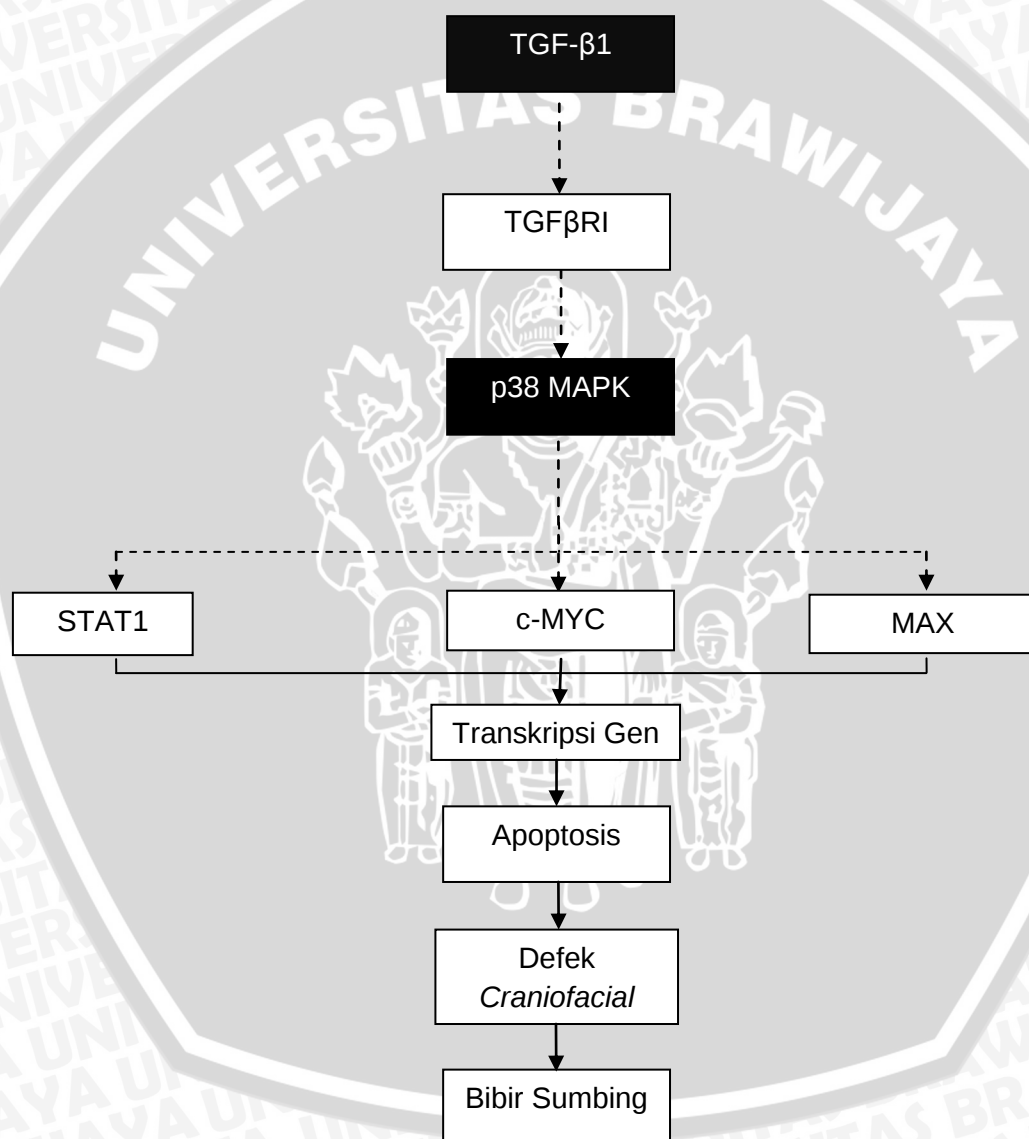


Gambar 2.9 : Crosstalk Protein p38 MAPK dengan Jalur TGFβ (www.genome.jp)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:



Penjelasan kerangka konsep :

Aktivasi dari jalur TGF- β memiliki efek terhadap sel untuk melakukan proses apoptosis.

Dalam proses apoptosis, protein TGF- β 1 akan berikatan dengan TGF β RI pada permukaan sel yang kemudian mengaktifkan protein p38 MAPK. Aktivasi protein p38 akan mengaktifasi faktor-faktor transkripsi seperti STAT1 , MAX, c-MYC. Selanjutnya terjadi proses transkripsi pada DNA yang mengakibatkan sel tersebut mengalami apoptosis. Proses apoptosis merupakan salah satu respon selular yang terdeteksi pada kejadian bibir sumbing.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat ekspresi protein TGF- β 1 pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur
2. Terdapat ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur
3. Ada hubungan antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur
4. Terdapat hubungan yang positif antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain *cross-sectional analytic* untuk membandingkan ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK, yang bertujuan untuk mengetahui hubungan ke 2 protein tersebut pada kejadian bibir sumbing.

Metode ini meliputi 2 tahap, yaitu tahap pewarnaan imunohistokimia pada jaringan bibir sumbing, kemudian dilanjutkan dengan tahap penghitungan jumlah sel epitel epidermis pada jaringan bibir sumbing yang mengekspresikan protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Subyek

Populasi penelitian ini adalah penduduk provinsi Nusa Tenggara Timur ras *Protomalayid*

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah jaringan sisa operasi bakti sosial bibir sumbing yang diadakan di provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.2.3 Kriteria Inklusi

Penduduk ras *Protomalayid* provinsi NTT (Nusa Tenggara Timur) dengan celah bibir.

4.2.4 Kriteria Eksklusi

Pasien dengan celah palatum, usia, dan jenis kelamin.

4.2.5 Prosedur Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari penyimpanan jaringan bibir sumbing hasil operasi oleh tim bedah plastik rumah sakit Saiful Anwar Malang pada kegiatan bakti sosial tanggal 3,6,7,8 dan 12 Desember 2012 Di RSUD Larantuka Kupang, RSUD Kupang, RSUD Alor Nusa Tenggara Timur.

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan *non random sampling* dengan metode teknik *purposive sampling*.

4.2.6 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang diambil adalah sesuai dengan pasien yang datang untuk dilakukan operasi bibir sumbing pada bakti sosial tim bedah plastik rumah sakit Saiful Anwar Malang pada kegiatan baksos tanggal 3,6,7,8 dan 12 Desember 2012 di RSUD Larantuka Kupang, RSUD Kupang, RSUD Alor NTT.

4.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid*.
2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK.

4.4 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia FKUB, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, dan Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya

4.5 Waktu Penelitian

Dilakukan dari bulan Oktober 2013 sampai November 2013

4.6 Bahan dan Alat/Instrument Penelitian

4.6.1 Pembuatan parafin blok

Alat : Rotary Microtome, Object Glass, Holder.

Bahan : Phospat Buffer Solution (PBS), Formalin 10%, Alkohol (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut), Xilol, Parafin, Gelatin 5%, Beaker glass 250mL.

4.6.2 Proses Deparafinasi

Bahan : Hasil parafin blok, xilol, Alkohol berseri (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut), dH₂O.

4.6.3 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin

Alat : Preparat jaringan, cover glass.

Bahan : PBS pH 7,4, Hematoxilen, tap water, dH₂O, Alkohol berseri (30% dan 50%), Eosin.

4.6.4 Proses Imunohistokimia

Alat : Preparat, cover glass, mikroskop cahaya

Bahan : PBS pH 7,4, H₂O₂ 3%, FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100, Monoklonal antibodi TGF- β 1 dan p38 MAPK, anti mouse HRP conjugated, Diamino Benzidine (DAB), Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxilen, tap water, dH₂O.

4.6.5 Perhitungan Terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia dan Histokimia

Alat : Mikroskop cahaya Nikon YS100

Bahan : Preparat

4.7 Definisi/Istilah Operasional

1. Preparat Jaringan Bibir Sumbing

Merupakan jaringan lapisan kulit yang berasal dari operasi pasien bibir sumbing yang tidak terpakai ketika dilakukan operasi bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Jaringan dipotong dengan menggunakan rotary microtome setebal 4-6 μ m kemudian dilakukan *mounting* pada gelas objek dengan gelatin 5%

2. Monoklonal antibodi TGF- β 1 dan p38 MAPK

Monoklonal antibodi TGF- β 1 dan p38 MAPK diperoleh dari laboratorium biokimia FKUB. Merupakan antibodi yang mengikat protein TGF- β 1 dan p38 MAPK dan memberikan warna coklat pada pemeriksaan immunohistokimia pada sel yang mengekspresikan TGF- β 1 dan p38 MAPK.

3. Ekspresi Protein

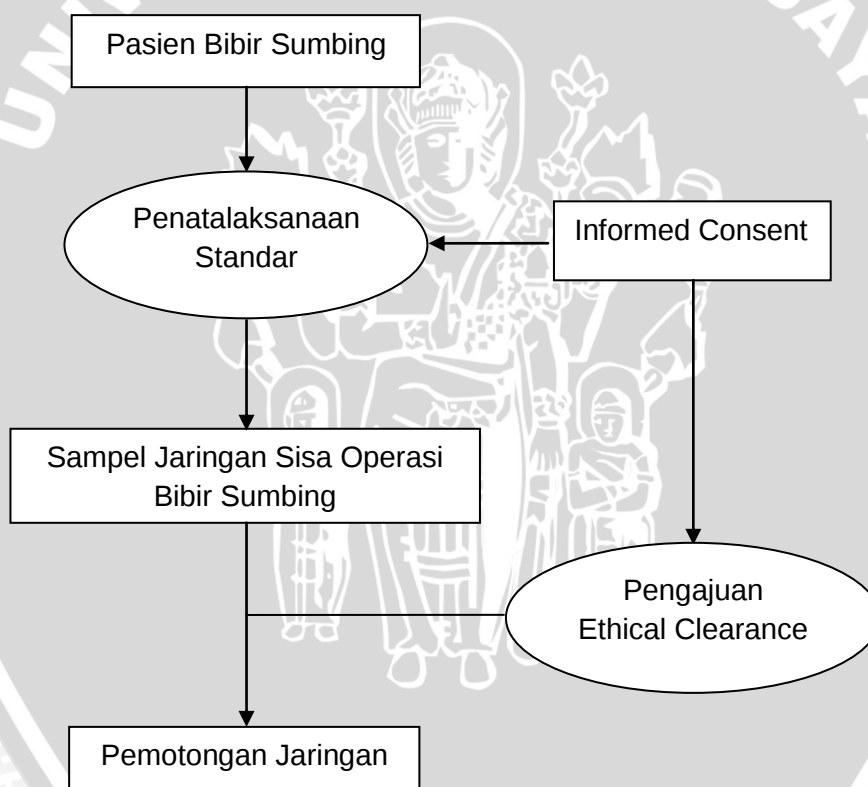
Sel yang mengekspresikan protein TGF- β 1 dan p38 MAPK adalah sel yang berwarna coklat pada pemeriksaan dengan mikroskop. Warna coklat pada preparat yang sudah diberi antibodi monoklonal protein TGF- β 1 terlihat pada daerah sitoplasma tiap sel dan pada preparat yang sudah diberi antibodi monoklonal protein p38 MAPK warna coklat terlihat pada inti dari tiap sel. Penentuan warna coklat yang positif yaitu dengan mencocokkan warna coklat pada preparat dengan warna coklat yang ada di panduan pewarnaan immunohistokima dari *Santa Cruz*

Biotechnology.

4.8 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Pengamatan ekspresi TGF- β 1 dan protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di Provinsi Nusa Tenggara Timur dilakukan dengan teknik pewarnaan rutin dan *immunostaining*.

4.8.1 Alur Penelitian



Pewarnaan imunohistokimia

Penghitungan p38 MAPK dan TGF- β 1

4.8.2 Pengambilan Jaringan Preparat

Jaringan diambil dari hasil operasi pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur lalu dikirim dan diserahkan ke Laboratorium Biokimia FKUB untuk disimpan sebelum dipotong untuk pembuatan parafin blok.

4.8.3 Pembuatan Sediaan Parafin Blok

Jaringan dicuci dengan PBS 3-5 x untuk membersihkan dari kontaminan. Kemudian difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan blok dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6µm dengan rotary microtome. Dilakukan *mounting* pada gelas objek dengan gelatin 5%.

4.8.4 Proses Deparafinisasi

Gelas obyek hasil parafin block direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH₂O selama 5 menit.

4.8.5 Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit. Setelah itu, direndam dalam tap water selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan dH₂O. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit. Kemudian

diwarnai dengan larutan Eosin selama 3 menit. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%. Dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan dikering anginkan. Kemudian dilakukan *mounting* dengan entelan dan tutup dengan cover glass.

4.8.6 Proses Imunohistokimia

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Bloking *unspecific* protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan monoklonal antibodi TGF-β1 atau p38 MAPK (LabVision), selama 60 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Inkubasi menggunakan anti mouse HRP conjugated selama 40 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit. Cuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan Meyer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan tap water. Bilas menggunakan dH₂O dan kering anginkan. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan cover glass. Amati pada mikroskop cahaya.

4.8.7 Metode Perhitungan Terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia dan Histokimia

Penelitian ini menggunakan jaringan kulit bibir sumbing. Dengan derajat kepercayaan 99% dengan desain observasi crossectional.

1. Terdapat 60 slide (jumlah slide), yang terdiri dari 30 slide pewarnaan histokimia dengan antibodi monoklonal TGF-β1 dan 30 slide pewarnaan histokimia dengan antibodi monoklonal p38 MAPK. Setiap sampel

jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μ m, kemudian dideteksi:

- a. Pemeriksaan Hematoxilen-Eosin pengamatan struktural epitel
 - b. Pemeriksaan immunohistokimia terhadap ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK untuk melihat jumlah sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing yang mengekspresikan protein TGF- β 1 dan p38 MAPK.
2. Pemeriksaan dan perhitungan ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK diamati ekspresinya dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel untuk TGF- β 1 dan pada inti sel untuk protein p38 MAPK, yang dihitung menurut Soini et al, (1998) dan Pizem and Cor (2003). Masing-masing slide diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 20 lapang pandang. Lalu dihitung jumlah sel yang berwarna coklat yang menandakan protein tersebut diekspresikan. Untuk warna coklat yang positif ditentukan dengan menyesuaikan dengan warna coklat yang ada pada *Santa Cruz Biotechnology protein database*.
 3. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang
 4. Dilakukan pemulasan Hematoxilen-Eosin yang digunakan sebagai konfirmasi struktural sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing.
 5. Analisis statistik bila semua hasil sudah dihitung dan dicatat.
 6. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang

dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Soini et al, 1998; Pizem and Cor, 2003).

Pengumpulan data :

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi preparat jaringan bibir sumbing kelompok ras protomalaid berdasarkan penghitungan ekspresi protein TGF- β 1 dan p38 MAPK setelah dilakukan pewarnaan imunohistokima yang diberi monoklonal antibodi TGF- β 1 dan p38 MAPK per 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x.

4.9 Analisis Data

Analisis data statistik menggunakan SPSS ver. 19.0. Untuk langkah awal diperlukan uji normalitas untuk melihat sebaran normal dari data yang dihasilkan menggunakan analisis non parametrik *Kolmogorov smirnov*.

Setelah diperoleh jumlah sel yang mengekspresikan protein TGF- β 1 dan p38 MAPK, kemudian data-data tersebut dianalisis menggunakan uji statistik *linear correlation (pearson)*. Uji statistik *linear correlation* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK dan bagaimana hubungan tersebut, apakah dengan tingginya ekspresi protein TGF- β 1 akan diikuti juga dengan tingginya ekspresi protein p38 MAPK, dan sebaliknya.

BAB 5

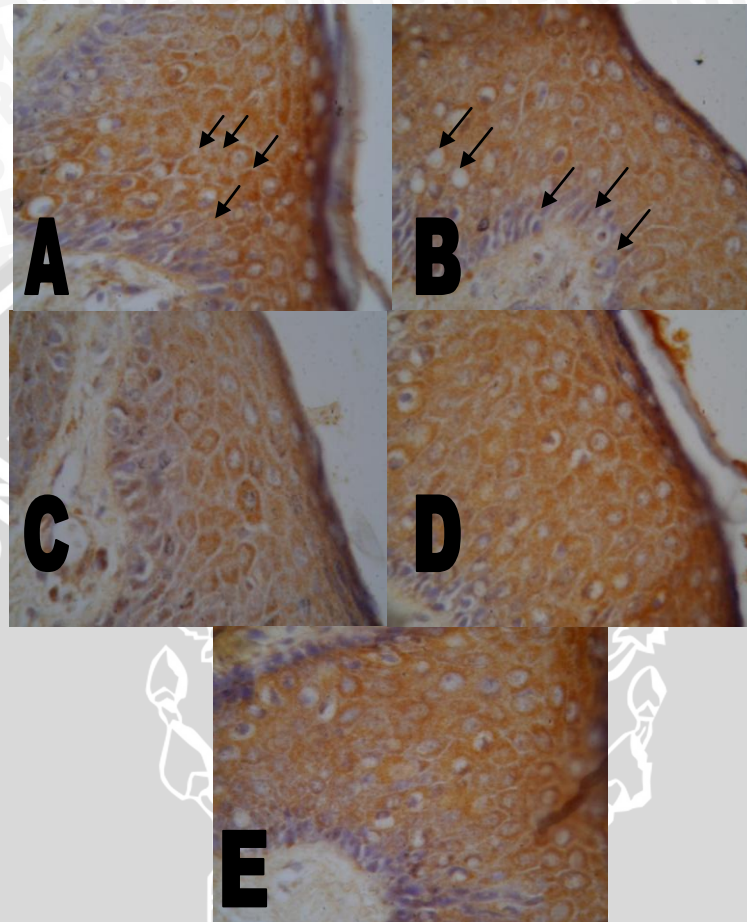
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Pengumpulan Data

Data yang diambil untuk penelitian ini berasal dari jaringan hasil operasi perbaikan bibir sumbing dari pasien dengan celah bibir tanpa disertai celah langit-langit, jenis kelamin laki-laki dan perempuan, yang berumur 5 bulan hingga 27 tahun dan tergolong ras *Protomelayid* provinsi Nusa Tenggara Timur.

5.2 Ekspresi Protein TGF- β 1

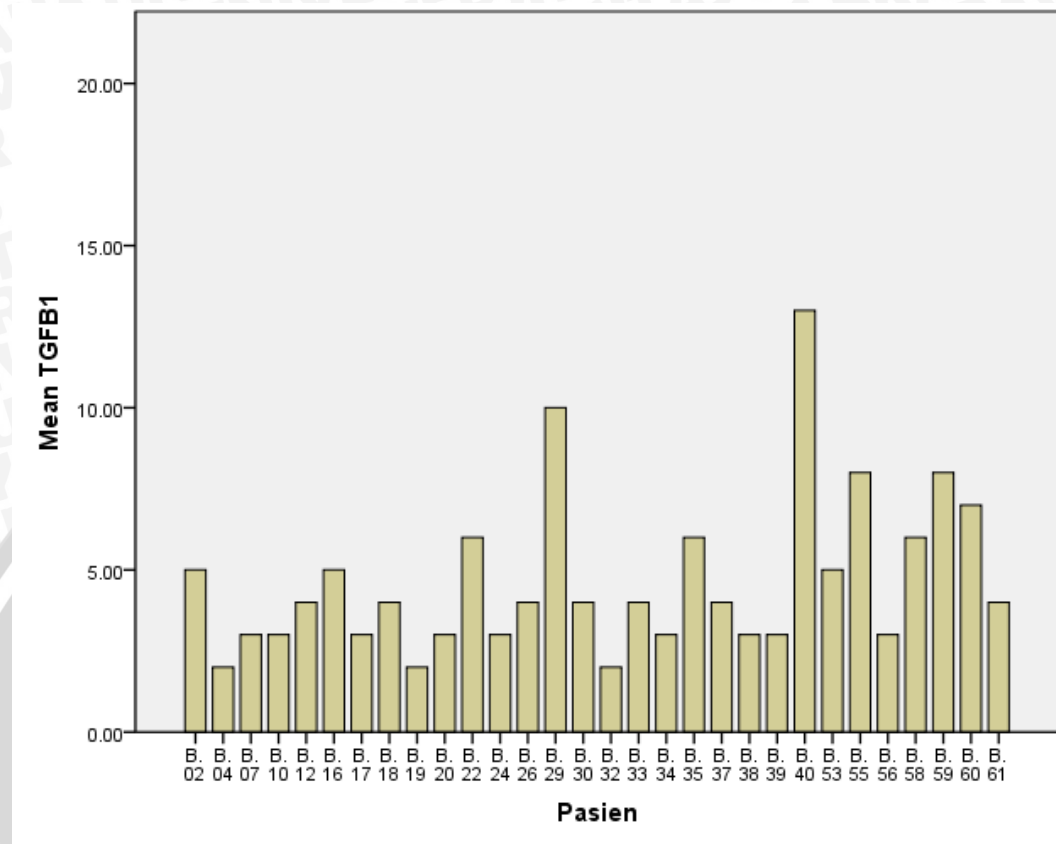
TGF- β 1 merupakan protein yang meregulasi proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel. Pada bibir sumbing ekspresi protein ini berpengaruh terhadap proses apoptosis. Ekspresi protein TGF- β 1 pada jaringan bibir sumbing dapat diamati pada daerah sitoplasma setiap sel. Jumlah sel yang mengekspresikan protein TGF- β 1 pada masing-masing pasien yang telah diperiksa dibawah mikroskop cahaya Nikon YS100 dengan perbesaran 1000x dengan 20 lapang pandang yang difoto dengan kamera Nikon AW100 dapat dilihat pada gambar 5.1 dan tabel 5.1. Hasil pengamatan menunjukkan ekspresi protein TGF- β 1 hanya terekspresi pada lapisan suprabasal (stratum korneum dan stratum spinosum), sedangkan pada lapisan basalis tidak terdapat ekspresi protein TGF- β 1.



Gambar 5.1 Ekspresi protein TGF- β 1 pada sitoplasma sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. **(A)** tanda panah menunjukkan daerah sitoplasma sel pada jaringan yang mengekspresikan protein TGF- β 1 terlihat lebih gelap, **(B)** menunjukkan sel dari jaringan yang tidak mengekspresikan protein TGF- β 1 terlihat lebih terang , **(C)(D)(E)** pengamatan pada pasien bibir sumbing yang lain.

Tabel 5.1 Jumlah rata-rata ekspresi protein TGF- β 1 dari 20 lapangan pandang dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x pada 30 pasien.

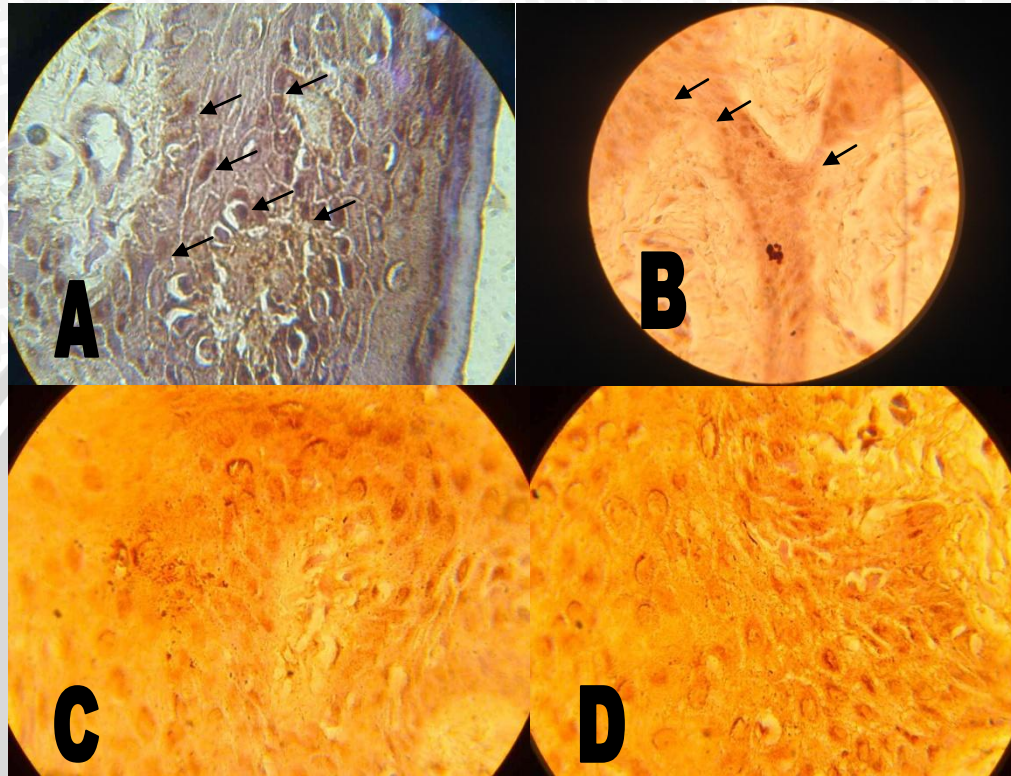
Pasien	TGFB1	Pasien	TGFB1
B.16	5	B.07	3
B.55	8	B.35	6
B.61	4	B.33	4
B.12	4	B.30	4
B.32	2	B.24	3
B.60	7	B.59	8
B.26	4	B.56	3
B.29	10	B.40	13
B.17	3	B.39	3
B.58	6	B.37	4
B.53	5	B.34	3
B.22	6	B.19	2
B.18	4	B.10	3
B.38	3	B.04	2
B.20	3	B.02	5



Gambar 5.2 Grafik dari jumlah ekspresi protein TGF- β 1 per lapangan pandang pada setiap pasien.

5.3 Ekspresi Protein p38 MAPK

p38 MAPK merupakan protein yang mengatur proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel tergantung dari stimulus yang diterimanya. Aktivasi protein TGF- β 1 pada keadaan bibir sumbing akan mengaktifkan protein p38 MAPK untuk menginisiasi proses apoptosis sel. Ekspresi protein p38 MAPK pada jaringan bibir sumbing dapat diamati pada daerah inti setiap sel. Dari data Jumlah sel yang mengekspresikan protein p38 MAPK pada masing-masing pasien yang telah diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dengan 20 lapang pandang dapat dilihat pada gambar 5.3 dan tabel 5.2. Hasil pengamatan menunjukkan ekspresi protein p38 MAPK terdapat pada setiap lapisan (stratum korneum, stratum spinosum, dan stratum basale).

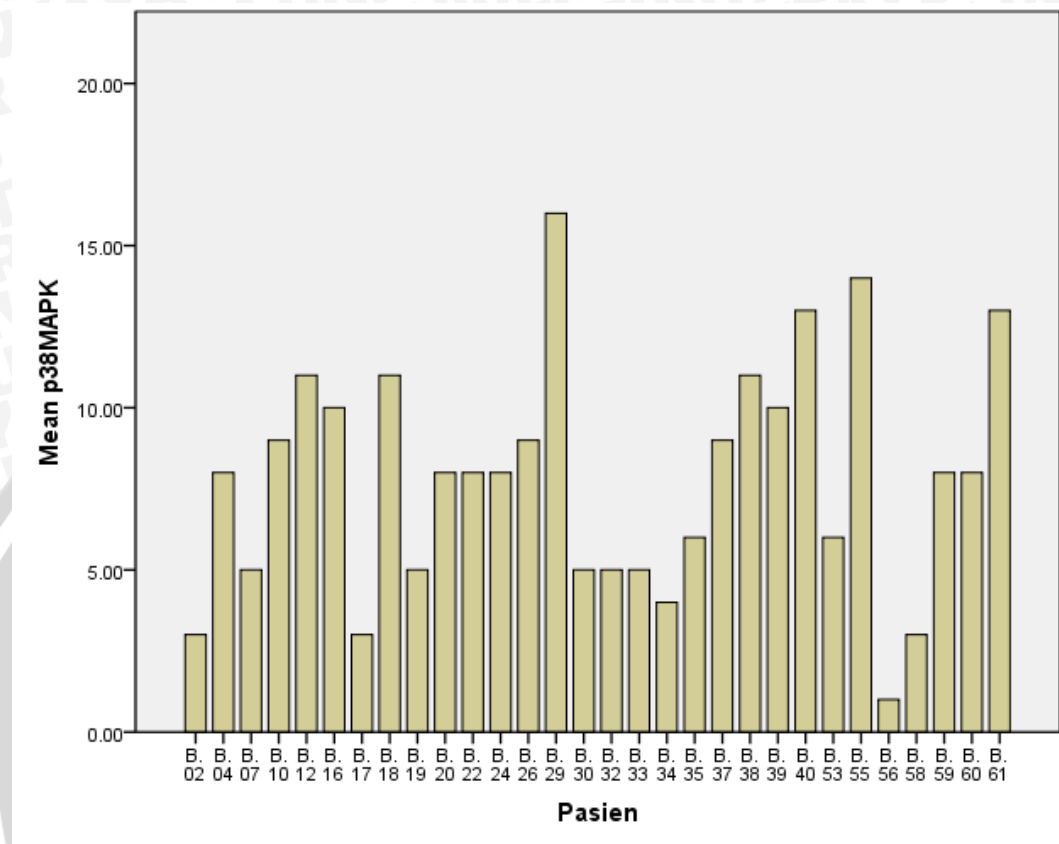


Gambar 5.3 Ekspresi protein p38MAPK pada inti sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. (A) tanda panah menunjukkan daerah inti sel pada jaringan yang mengekspresikan protein p38MAPK terlihat lebih gelap, (B) menunjukkan sel dari jaringan yang tidak mengekspresikan protein p38MAPK terlihat lebih terang, (C)(D) pengamatan pada pasien bibir sumbing yang lain.

Tabel 5.2 Jumlah rata-rata ekspresi protein p38 MAPK dari 20 lapangan pandang dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x pada 30 pasien.

Pasien	p38MAPK
B.16	10
B.55	14
B.61	13
B.12	11
B.32	5
B.60	8
B.26	9
B.29	16
B.17	3
B.58	3
B.53	6
B.22	8
B.18	11
B.38	11
B.20	8

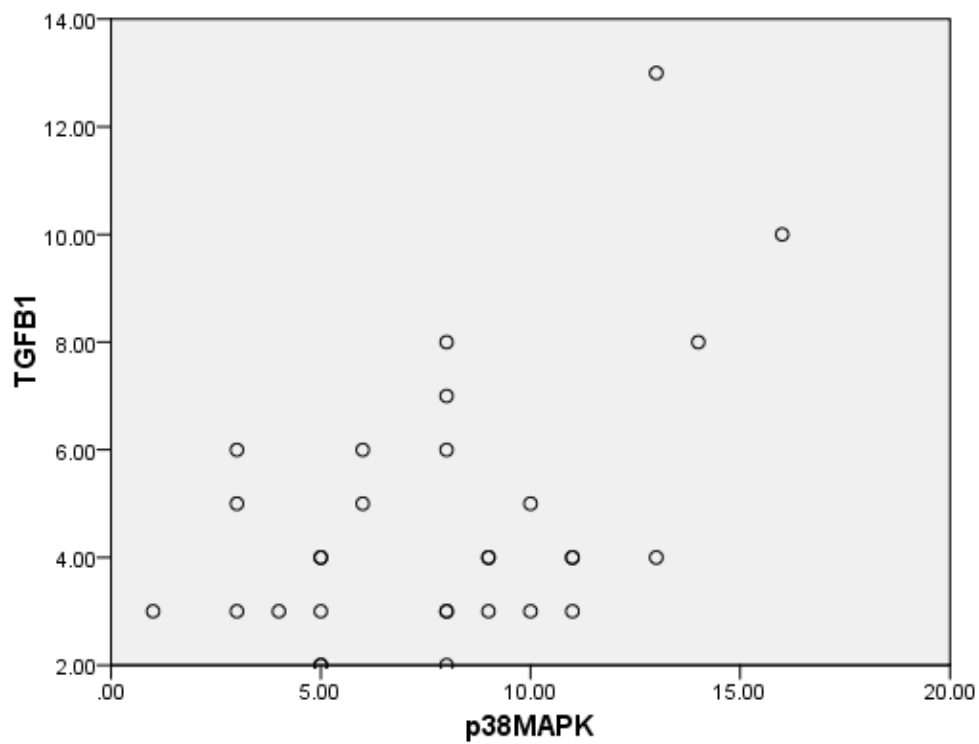
Pasien	p38MAPK
B.07	5
B.35	6
B.33	5
B.30	5
B.24	8
B.59	8
B.56	1
B.40	13
B.39	10
B.37	9
B.34	4
B.19	5
B.10	9
B.04	8
B.02	3



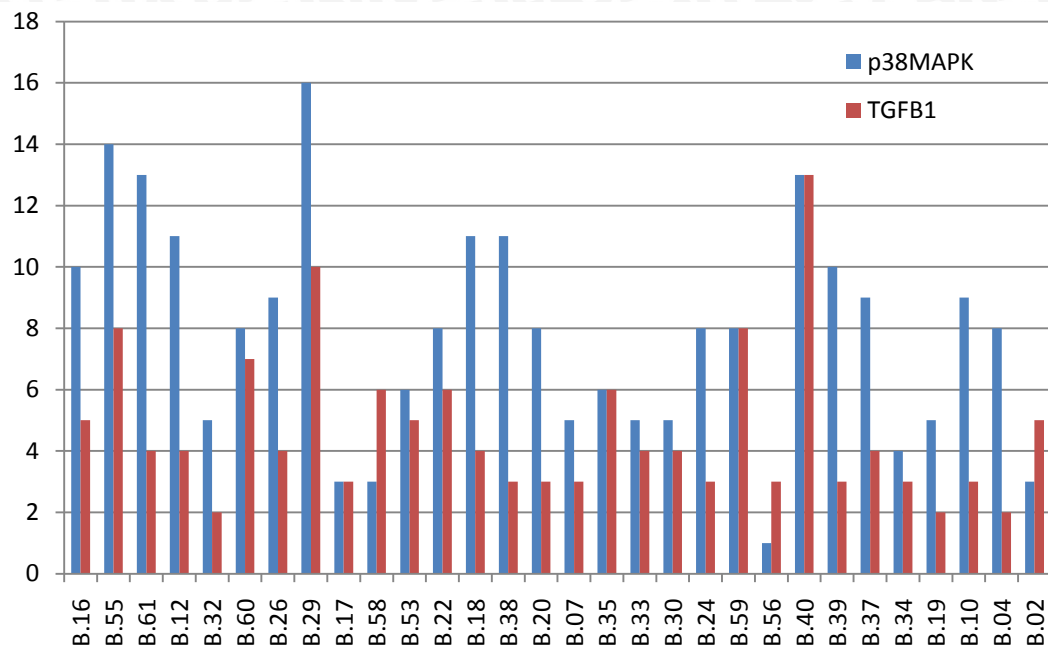
Gambar 5.4 Grafik dari jumlah ekspresi protein TGF- β 1 per lapangan pandang pada setiap pasien.

Tabel 5.3 Perbandingan ekspresi protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK

Pasien	p38MAPK	TGFB1
B.16	10	5
B.55	14	8
B.61	13	4
B.12	11	4
B.32	5	2
B.60	8	7
B.26	9	4
B.29	16	10
B.17	3	3
B.58	3	6
B.53	6	5
B.22	8	6
B.18	11	4
B.38	11	3
B.20	8	3
B.07	5	3
B.35	6	6
B.33	5	4
B.30	5	4
B.24	8	3
B.59	8	8
B.56	1	3
B.40	13	13
B.39	10	3
B.37	9	4
B.34	4	3
B.19	5	2
B.10	9	3
B.04	8	2
B.02	3	5



Gambar 5.5 Ekspresi protein TGF-β1 dan protein p38 MAPK pada setiap pasien.



Gambar 5.6 Ekspresi protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK pada setiap pasien.

Gambar dari sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras protomalayid yang mengekspresikan protein TGF- β 1 diperlihatkan pada gambar 5.1 dimana terlihat adanya warna coklat yang berada pada sitoplasma, sedangkan pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing yang mengekspresikan protein p38 MAPK diperlihatkan pada gambar 5.3 dimana warna coklat berada pada daerah inti sel. Perbandingan jumlah ekspresi protein TGF- β 1 dan p38 MAPK ditunjukkan pada gambar 5.5 dan gambar 5.6 dimana terlihat secara umum bahwa saat protein TGF- β 1 pada sel terekspresi maka protein p38 MAPK terekspresi lebih tinggi.



5.4 Analisis Data

Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 19.0 Analisis statistik dalam penelitian ini adalah uji normalitas kemudian dilanjutkan uji korelasi. Tes kepercayaan dari penelitian ini adalah 99%. Untuk mengetahui uji korelasi yang digunakan dalam analisis, maka perlu dilakukan uji normalitas terlebih dahulu.

Hasil uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* diperoleh nilai signifikansi 0.066 pada variabel protein TGF- β 1, dan pada tabel protein p38 MAPK diperoleh nilai signifikansi 0.795. Hasil ini menunjukkan distribusi data normal karena distribusi dianggap normal bila nilai signifikansi $>0,05$. Oleh karena syarat normalitas terpenuhi, maka data dalam penelitian ini dapat diproses dengan analisis statistik parametrik. Berdasarkan jenis data yang merupakan jenis data berskala rasio, dan kedua variabel bersifat independen maka analisis parametrik yang digunakan adalah uji *Pearson* (*linear correlation*). (Sarwono, 2011)

5.4.1 Analisis Data dengan Uji Korelasi *Pearson*

Setelah dilakukan uji normalitas diantara variabel, selanjutnya akan dilakukan uji korelasi untuk menunjukkan ada tidaknya hubungan antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada bibir sumbing dan seberapa kuat hubungan tersebut.

Dari hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan hasil signifikansi (0,007) yang berarti signifikan (signifikansi = 0,01) serta koefisien korelasi yang cukup kuat dan bersifat positif. Hasil korelasi yang didapat yaitu 0.482. Hal ini berarti saat protein TGF- β 1 terekspresi pada sel maka protein p38 MAPK juga terekspresi pada sel. Dan terdapat hubungan yang cukup antara ekspresi protein TGF- β 1

dan ekspresi protein p38 MAPK. Berdasarkan kriteri (Sarwono, 2006) :

Nilai Korelasi 0 : tidak ada korelasi antara dua variabel

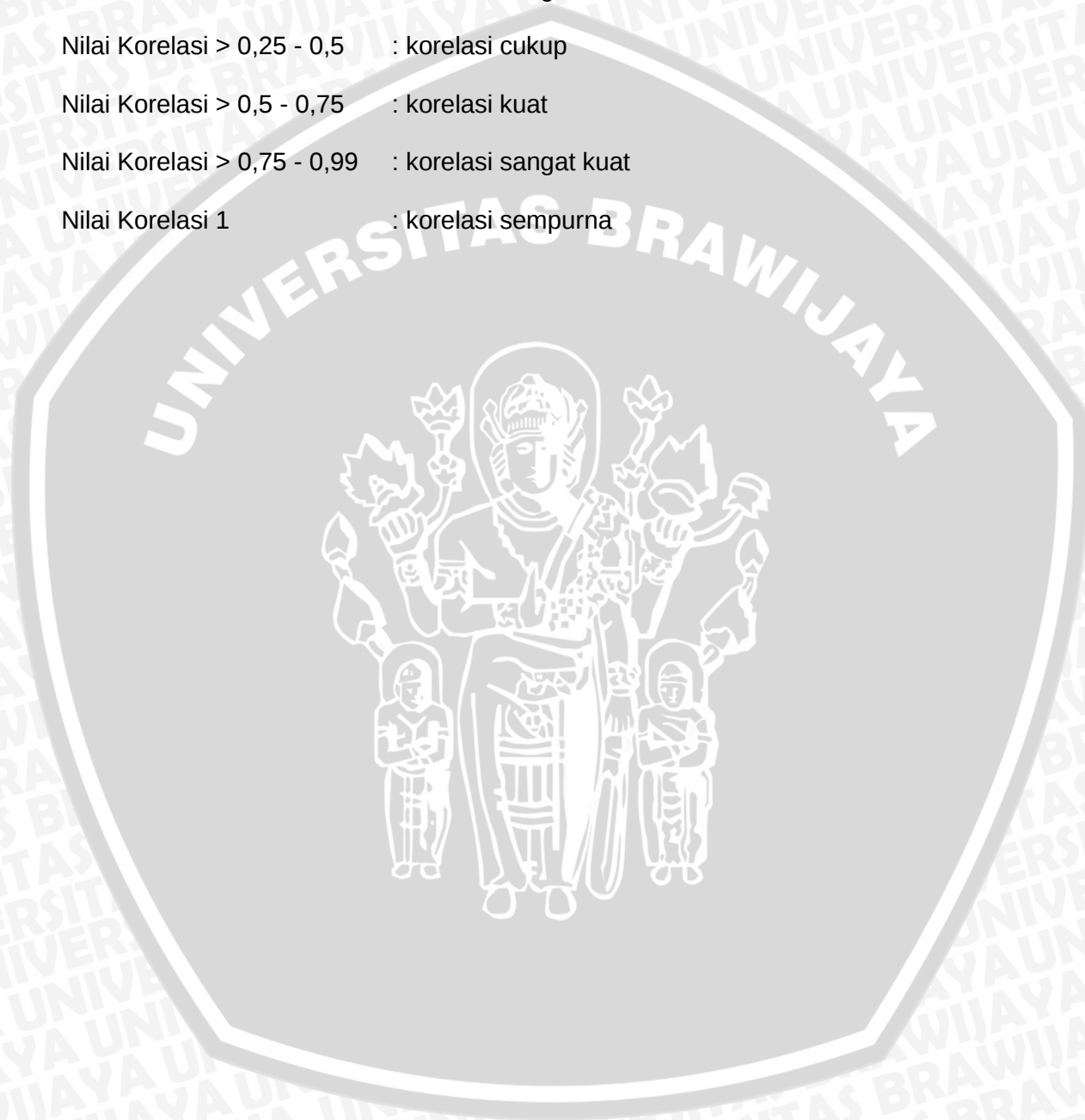
Nilai Korelasi $> 0 - 0,25$: korelasi sangat lemah

Nilai Korelasi $> 0,25 - 0,5$: korelasi cukup

Nilai Korelasi $> 0,5 - 0,75$: korelasi kuat

Nilai Korelasi $> 0,75 - 0,99$: korelasi sangat kuat

Nilai Korelasi 1 : korelasi sempurna



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekspresi Protein TGF- β 1 pada Sel Epitel Epidermis Jaringan Bibir**Sumbing Ras *Protomalayid***

Protein TGF- β 1 adalah protein yang berfungsi sebagai regulator proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel (Wallace and Hardy, 2005). Pada kondisi bibir sumbing pemeriksaan dengan *TUNEL test* menunjukkan adanya proses apoptosis, dan salah satu protein yang berperan dalam terjadinya proses apoptosis adalah TGF- β 1 (Krivicka-Uzkurele, *et al.*, 2008). Beberapa penelitian secara *in vivo* membuktikan bahwa protein TGF- β 1 bekerja sebagai penghambat yang poten pada sel-sel yang sedang berproliferasi sehingga sel tersebut mati (apoptosis) (Moses, 1991). Sehingga salah satu sebab kegagalan pembentukan daerah wajah pada masa intrauterin dipengaruhi oleh proses apoptosis akibat protein TGF- β 1. Hasil penelitian (Tabel 5.1) menunjukkan jumlah ekspresi protein TGF- β 1 pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid*. Protein TGF- β 1 terbukti diekspresikan dengan jumlah rata-rata 5 sel per lapangan pandang pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid*. Dari hasil penelitian ekspresi protein TGF- β 1 hanya terdapat pada lapisan supra basal (stratum korneum dan stratum spinosum) sedangkan pada lapisan basal tidak ada ekspresi protein TGF- β 1. Tidak terdapatnya ekspresi protein TGF- β 1 pada lapisan basal disebabkan karena sel keratinosit yang merupakan prekursor apoptosis baru diproduksi pada lapisan suprabasal, sehingga proses apoptosis pun baru dimulai dari lapisan suprabasal (Raj, *et al.*,

2006; Lautenschlager, 2011).

6.2 Ekspresi Protein p38 MAPK pada Sel Epitel Epidermis Jaringan Bibir Sumbing Ras *Protomalayid*

Protein p38 MAPK adalah protein yang dapat berfungsi untuk proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel sesuai dengan stimulus yang diterima reseptor protein ini (Porras dan Guerrero, 2010). TGF- β 1 merupakan salah satu stimulus yang akan mengaktifkan protein p38 MAPK dan berdampak pada *cell signalling* yang berujung pada apoptosis sel (Iwata, *et. al.*, 2012). Ekspresi protein TGF- β 1 berhubungan secara positif dengan ekspresi protein p38 MAPK sehingga pengaktifan protein TGF- β 1 akan berpengaruh pada pengaktifan protein p38 MAPK. Hasil penelitian (Tabel 5.2) membuktikan protein p38 MAPK juga terekspresi dengan jumlah rata-rata 8 sel per lapangan pandang pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid*. Berbeda dengan ekspresi protein TGF- β 1, ekspresi protein p38 MAPK terdapat pada setiap lapisan kulit (stratum korneum, stratum spinosum, stratum basale). Oleh karena itu protein p38MAPK yang terekspresi pada lapisan basal bukan merupakan pengaruh dari protein TGF- β 1.

6.3 Hubungan Ekspresi Protein TGF- β 1 dan Protein p38 MAPK pada Sel Epitel Epidermis Jaringan Bibir Sumbing Ras *Protomalayid*

Jumlah ekspresi protein TGF- β 1 berhubungan dengan jumlah ekspresi protein p38 MAPK dikarenakan kedua protein bekerja secara sinergis pada jalur utama aktivasi TGF- β , sehingga banyaknya jumlah ekspresi protein TGF- β 1 akan diikuti juga dengan banyaknya ekspresi protein p38 MAPK (Cudrado, 2010). Data dari sel yang mengekspresikan protein TGF- β 1 dan p38 MAPK dapat dilihat pada

tabel 5.1 dan tabel 5.2. Dari data tersebut secara umum ekspresi protein p38MAPK lebih tinggi daripada protein TGF- β 1. Hal ini disebabkan karena protein TGF- β 1 merupakan aktivator dari protein p38 MAPK, selain itu protein TGF- β 1 juga hanya diekspresikan hanya pada lapisan supra basal sedangkan protein p38 MAPK diekspresikan pada setiap lapisan kulit.

Analisis statistik menggunakan uji *Pearson (linear correlation)* menunjukkan kedua protein ini berhubungan secara positif yang berarti saat protein TGF- β 1 terekspresi pada sel maka protein p38 MAPK juga terekspresi pada sel. Jika dilihat dari koefisien korelasi yaitu 0.482 dan signifikansi 0.007 menunjukkan bahwa benar protein TGF- β 1 dan p38 MAPK saling berhubungan secara positif dan signifikan, namun koefisien korelasi 0.482 masih jauh dari nilai sempurna yaitu 1. Hal ini menunjukkan bahwa dalam menginduksi proses apoptosis protein TGF- β 1 tidak hanya bekerja berdua dengan protein p38 MAPK namun juga melalui proses lain dan jalur aktivasi protein lain.

Ada dua jenis jalur TGF- β yaitu jalur TGF- β *SMAD-dependent* dan jalur TGF- β *SMAD-independent*. Aktivasi protein p38 MAPK termasuk kedalam jalur TGF- β *SMAD-independent*. Hasil penelitian yang menyatakan bahwa hubungan protein TGF- β 1 dan p38 MAPK memiliki koefisien korelasi yang masih jauh dari nilai sempurna yaitu 1 bisa disebabkan karena proses apoptosis tidak hanya terjadi melalui jalur TGF- β *SMAD-independent* namun juga melalui jalur TGF- β *SMAD-dependent*.

Terdapat tiga jenis protein Smad yang berpengaruh pada jalur TGF- β *SMAD-dependent* yakni reseptor Smads (R-Smads), co-Smads, dan penghambatan atau antagonis Smads. Jalur ini aktif pada saat residu dekat terminal C-R-Smads terfosforilasi dan mengaktifkan reseptor tipe I TGF- β . R-

Smads terfosforilasi dan membentuk dimer dengan Smads. Heterodimer ini selanjutnya melakukan translokasi menuju nukleus dan dengan faktor-faktor transkripsi lainnya bekerja sama untuk mengaktifkan gen-gen transkripsi pada sel target tertentu. R-Smads yang terbagi jadi dua bagian yakni MH1 dan MH2 dipisahkan oleh daerah linker yang fleksibel. Dalam keadaan tidak aktif, N-terminal domain menekan aktivitas transkripsi C-terminal domain MH1 dan MH2. Ketika Smads telah aktif, bagian terfosforilasi dari domain MH1 mengikat DNA, dan domain MH2 mengatur interaksi dengan Smads, sehingga mendorong interaksi dengan protein pengikat DNA untuk melakukan proses transkripsi. Faktor pertumbuhan reseptor spesifik superfamili TGF- β menimbulkan respons seluler yang berbeda tergantung dari reseptor yang terkait. Hal ini merupakan fenomena umum pada sistem sinyal interseluler. Dalam hal ini pengikatan TGF- β ke reseptornya menyebabkan fosforilasi Smad2, dimerisasi dengan Smad4, translokasi dari Smad2 atau Smad4 ke nukleus, dan mengaktifasi transkripsi gen-gen target tertentu (Rifa'i, 2009). Aktivasi dari Smad2 dan Smad4 ini sendiri nantinya akan mengaktifkan protein DAP-Kinase. Proses apoptosis melalui jalur DAP-Kinase (*death-associated protein kinase*) belum begitu diketahui secara detil, namun beberapa penelitian menjelaskan bahwa protein DAP-Kinase akan menekan fungsi integrin dan sinyal-sinyalnya dalam fungsinya sebagai pertahanan sel terhadap proses apoptosis, sehingga menyebabkan sel tersebut dapat apoptosis dengan mudah (Wang, 2002). Dari penjelasan diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam kejadian bibir sumbing yang ditinjau dari proses apoptosis sama sekali tidak dipengaruhi mutlak oleh satu protein dan satu jalur aktivasi protein saja, namun ada jalur aktivasi lain yang berpengaruh. Disamping itu juga harus diingat bahwa pembahasan ini masih terfokus pada proses

apoptosis, sedangkan teori terjadinya bibir sumbing bisa ditinjau dari proses proliferasi dan diferensiasinya juga. Hal ini menjelaskan bahwa dari sudut pandang faktor genetik sebagai penyebab terjadinya bibir sumbing sangatlah kompleks, banyak protein yang saling berkaitan satu dengan lainnya. Disisi lain faktor genetik bukanlah satu-satunya faktor penyebab terjadinya sumbing bibir. Faktor lain seperti faktor nutrisi dan faktor-faktor lainnya juga harus dipertimbangkan. Sehingga teori yang mengatakan bahwa penyebab bibir sumbing itu multifaktorial adalah benar (Prabhu, *et. al.*, 2012).



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Protein TGF- β 1 terekspresi pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur

7.1.2 Protein p38 MAPK terekspresi pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur

7.1.3 Ekspresi protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK memiliki hubungan pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur

7.1.4 Terdapat hubungan yang positif dan korelasi yang cukup antara ekspresi protein TGF- β 1 dan ekspresi protein p38 MAPK pada sel epitel epidermis jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* di provinsi Nusa Tenggara Timur

7.2 Saran

7.2.1 Penelitian lanjutan untuk mengetahui protein apa saja yang berpengaruh pada keadaan bibir sumbing.

7.2.2 Penelitian lanjutan untuk mengetahui jalur aktivasi secara detil dari protein-protein yang berpengaruh pada keadaan bibir sumbing.

7.2.3 Terdapatnya ekspresi protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing dapat dijadikan data dasar penelitian lanjutan untuk mengamati perubahan genetik yang terjadi akibat ekspresi protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK .

7.2.4 Terdapatnya ekspresi protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing ras *Protomalayid* di Provinsi Nusa Tenggara Timur dapat dijadikan data dasar penelitian lanjutan untuk membandingkan kadar protein TGF- β 1 dan protein p38 MAPK pada ras lain.

7.2.5 Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui ekspresi protein TGF β -1 dan ekspresi protein p38 MAPK menggunakan metode elisa pada pasien bibir sumbing.

7.2.6 Penelitian yang lebih detil mengenai ekspresi protein TGF β -1 yang tidak terdapat pada lapisan basal.



DAFTAR PUSTAKA

- Albery, E.H., I.S. Hathorn, and R.W. Pigott. 1986. *Cleft Lip and Palate a Team Approach*. Bristol: Wright. Pp: 8-9, 14-5, 21, and 75-7.
- Bartoshesky, L. E. 2008. <http://kidshealth.org/pagemanager/familydoctor&article/CLP>
- Bender L, Patricia. 2000. Genetic of Cleft Lip and Palate. *Journal of Pediatric Nursing Vol 15 No.43*.
- Berkowitz Samuel. 2006. Cleft Lip and Palate, Diagnosis and Management 2nd Edition. South Miami: Springer
- Converse JM, Hogan VM, McCarthy JG. 2006. Cleft Lip and Palate, *Introduction: Reconstructive Plastic Surgery, ed 11, vol. 4*. Philadelphia: WB Saunders.
- Cuadrado,A.and Nabreda,A.R.2010.Mechanism and functions of p38 MAPK signalling in Melchor F (Ed). *Biochem.J.*,Great Britain, p 403-417
- Davidson, Beth Noelle. 2012. Examining cleft lip and palate as a lifelong disease: genetic investigation of causes and outcomes. University of Iowa.
- Dixon Michael J, Marazita Mary L, Beaty Terri H, Murray Jeffrey C. 2011. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and enviromental influence. *Nat Rev Genet*. 2011 March ; 12(3): 167–178.
- Garcez LW and Giugliani ERJ. 2005. Population-Based Study on the Practice of Breastfeeding in Children Born With Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate – Craniofacial Journal Vol. 42 No. 6*.
- Gold, Li., Jussila, T., Fusenig, NE., Stenback, F.2000.TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes suggesting separate roles in skin carcinogenesis. (Abstract). *NCBI*.190(5):579-88
- GroPep.2005. *Transforming Growth Factor β (TGF β)-Mini Review*.GroPep, Adelaide, South Australia.
- Hidayat, Aziz Alimul. 2006. *Pengantar Ilmu Keperawatan Anak*. Jakarta: Salemba Medika.
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., et al. (2011). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse . *Nucleic Acids Research*.
- Iwata, J. Hacia, J. Suzuki, A. Sanchez-lara, P. Urata, M. Chai, Y. Modulation of

Noncanonical TGF- β Signalling Prevents Cleft Palate in *tgfr2* Mutant Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(3):877-885

Jagajan, K. (2009). *Cleft Lip*. Philadelphia: Medscape.

Keith P. Wilson. Matthew, J Fitzgibbon. Paul R. Caron, James P, Griffith. Wenyong Chen, Patricia. McCaffrey, Stephen P. Chambers. Michael. Crystal Structure of Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 : 27696-27700.

Kharmacharya J. 2009. Cleft Lip. <http://emedicine.medscape.com/article/877970-overview> Di akses tanggal 30 Desember 2012

Krivicka-Uzkurele, B., Pilmane, M., Akota, I. 2008. Barx1, growth factors and apoptosis in facial tissue of children clefts. (Abstracts). *NCBI*, 10(2):62-6

Kumphune, S. P38 MAPK Activation in Myocardial Ischemia. 2011. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.

Lautenschlager, H. 2011. The construction principle of the skin. *Kosmetik International*. (3):40-43

Mansjoer A, Ttriyanti K, Savitri R, et al. 2005. *Sumbing Bibir dan Langitan. Dalam: apita Selektia Jilid 2*. Jakarta: Media Aesculapius – FKUI.

Moses, H.L., Pietenpol, J.A., Munger, K., Murphy, C.S., Yang, E.Y. 1991. TGF beta regulation of epithelial cell proliferation: role of tumor suppressor genes. (Abstract). *NCBI*, 22:183-95.

Murray J.C. 2002. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 61:248–256

Nurul P, Hayati, R.S. 2008. Perawatan Celah Bibir Dan Langitan Pada Anak Usia 4 Tahun. *Indonesian Journal of Dentistry* 2008; 15 (3): 232-238.

Pardjianto, Bambang. 2005. *Pengaruh Defisiensi Zn Kronis Terhadap Kadar TGF- α darah Pada Kejadian Celah Bibir dan Langit-langit Non Sindromik*. Disertasi. Lab Bedah FKUB Malang.

Pedersen Gordon W. 1996. *Buku Ajar Praktis Bedah Mulut*. Jakarta: ECG.

Pizem, J., Cor, A., 2003, Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section, *Radiol. Oncol.*, 37(4): 225-232.

Porras, A. Guerrero, C. Role p38 α in Apoptosis : Implication in Cancer Development and Therapy. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2010

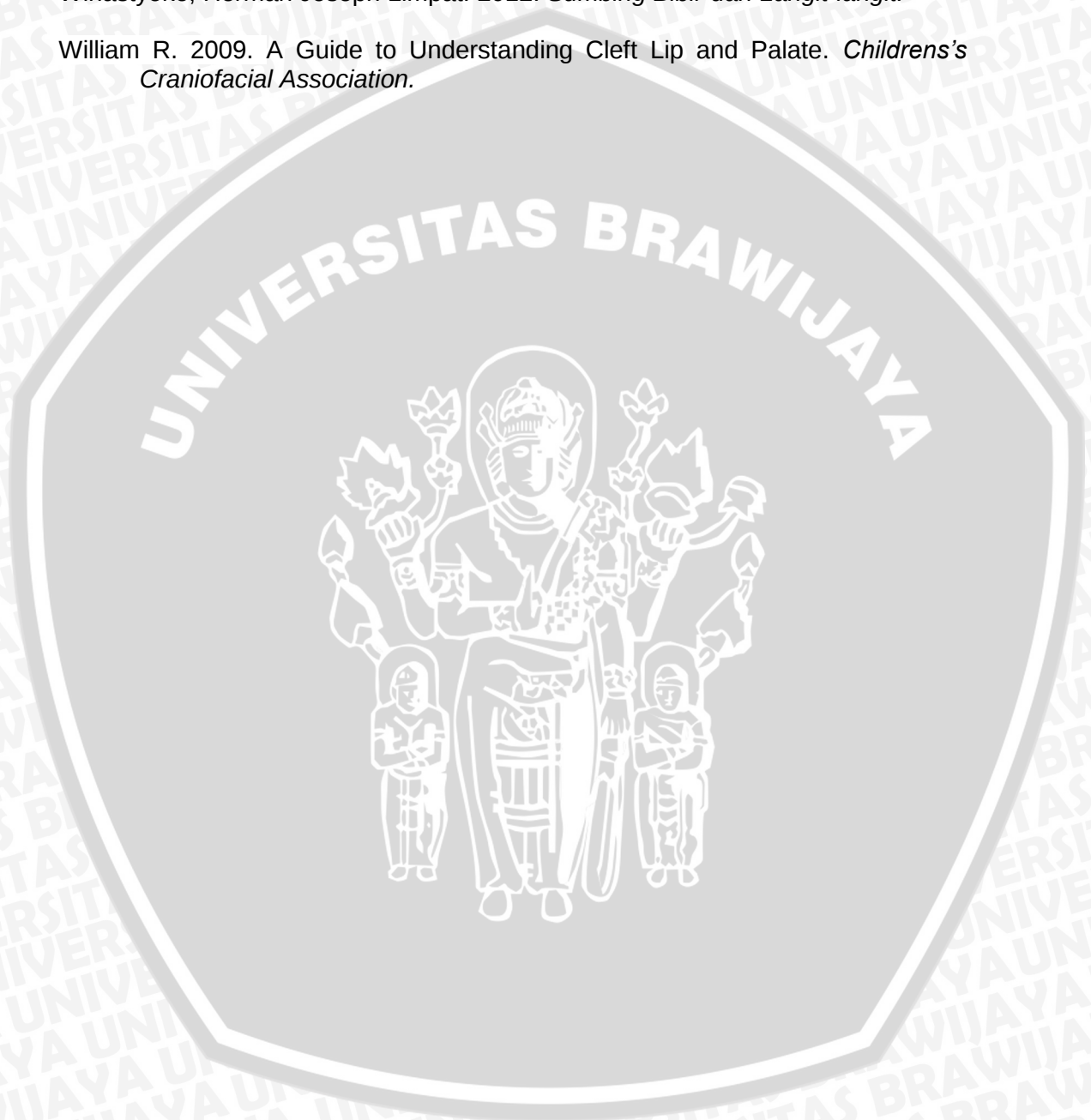
Prabhu S. Krishnapillai R, Jose M, Prabhu V. 2012. *Etiopathogenesis of orofacial clefting revisited*. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* Vol. 16 Issue

- Raj, D., Brash, DE., Grossman, D., 2006. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *NCBI*, 126(2):243-57.
- Rangeth BN, Joyson M, Sangethaa D. 2010. Multiple Supernumerary Teeth Associated With Missing Lateral Incisor In A Patient Who Treated For Cleft Lip And Palate: A Case Report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. (4):3604-3606.
- Rifa'i, M. (2009). *Buku ajar fisiologi MAB4232 : Signal transduksi dan sistem pertahanan tubuh*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Sanchez, C. 2005. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. (Abstract). *NCBI*, 16(1):15-34.
- Sarwono, Jonathan. 2011. *Buku Pintar IBM SPSS Statistics 19: Cara Operasi, Prosedur Analisis Data dan Interpretasi*. Jakarta : PT Elec Media Komputindo.
- Sjamsuhidajar R, De Jong W. 2005. *Buku Ajar Ilmu Bedah Jilid 2*. Jakarta: ECG.
- Soini, Y., Paakko, P. and Lehto, V-P. 1997, Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer, *American Journal of Pathology*, 153(4): 1041-1048.
- Stainer P and Moore, GE. 2004. Genetic of Cleft Lip and Palate: Syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic cleft. *Human Molecular Genetics, Vol 13*. Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, London W12 0NN, UK.
- Stoll, C., Mangsteab, S., Stoll, D., Riediger, D., Gressner, A. M., & Weiskirchen, R. (2004). Analysis of polymorphic TGFB1 codons 10, 25, and 263 in a German patient group with non-syndromic cleft lip, alveolus, and palate compared with healthy adults. *NCBI*.
- Sudiono Janti. 2009. *Gangguan Tumbuh Kembang Dentokraniofasial*. Jakarta: ECG
- Supit, L., & Prasetyono, T. (2008). Epidemiology, risk factors, quality of life, and importance of classification. *cleft lip and palate review*, 226.
- Thomson. 1986. Genetic in medicine, fourth edition. Co. Igaku Shoin, Philadelphia London: WB. Saunders.
- U.S. National Library of Medicine. 2012. TGF-β-1, [Lister Hill National Center for Biomedical Communications](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/listerhillnationalcenterforbiomedicalcommunications/). United states.
- Utama, Herry Setya Yudha. 2012. Labiopalatoschizis dan penanganannya. <http://www.herryudha.com/2012/06/labipalatoschizis-dan-penangannya.html>

Wang, Won-Jing., Kuo, Jean-Cheng., Yao, Chung-Chen., Chen, Ruey-Hwa. 2002. DAP-Kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. *JCB Article*, p. 169-179

Wihastyoko, Herman Joseph Limpat. 2012. *Sumbing Bibir dan Langit-langit*.

William R. 2009. A Guide to Understanding Cleft Lip and Palate. *Children's Craniofacial Association*.



LAMPIRAN																			
Hasil Penghitungan Protein																			
GF-β1																			
Jumlah (per lapangan pandang 1000x)																			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
3	0	1	3	4	4	10	5	4	14	7	4	13	10	0	9	7	2		
12	13	11	17	7	21	9	19	7	1	1	2	3	3	4	3	5	2		
1	2	4	3	2	0	5	5	5	7	15	6	5	4	3	5	7	5		
4	3	0	2	0	3	5	4	4	3	5	1	3	13	4	5	8	4		
1	2	4	1	2	0	9	10	1	0	0	2	1	0	2	2	1	1		
6	10	16	12	14	9	2	3	3	1	2	2	4	9	9	11	4	1		
1	2	4	1	2	3	4	3	4	1	2	3	6	7	6	9	5	2		
6	2	4	15	7	11	14	13	18	13	13	22	2	5	11	10	16	8		
3	2	4	1	2	3	2	9	4	3	4	3	5	3	5	2	2	0		
4	7	5	5	7	6	7	4	7	8	5	4	5	5	7	0	4	8		
7	4	14	9	17	12	0	5	2	6	1	3	1	4	4	2	4	1		
9	1	36	5	8	14	2	2	3	1	0	2	1	4	5	7	3	3		
10	6	8	10	3	0	7	6	1	0	0	0	2	2	1	1	1	1		
1	2	6	5	9	0	1	8	3	8	0	1	0	3	3	9	0	1		
7	3	1	2	4	4	9	2	5	0	3	0	1	0	0	0	1	4		
3	2	2	2	4	2	2	2	0	0	0	1	1	2	2	9	0	14		
11	7	8	5	11	5	4	5	6	10	17	8	6	6	5	1	2	2		
2	2	4	12	7	10	8	11	0	6	5	6	2	0	1	2	0	0		
5	7	6	1	6	1	5	4	6	7	7	1	6	2	6	0	8	2		
1	2	2	4	3	2	1	8	3	3	3	4	9	2	5	2	0	1		
4	7	5	4	5	8	13	18	7	1	9	15	1	24	10	9	5	2		
1	0	2	1	2	6	7	9	5	5	2	3	2	0	4	1	0	0		
3	8	16	10	9	6	12	9	17	7	22	13	16	9	23	7	20	15		
0	0	2	2	1	1	0	5	2	3	13	5	8	0	0	7	2	7		
5	3	6	6	9	4	2	2	6	4	1	5	3	1	0	1	1	0		
3	3	3	5	7	4	3	0	2	3	4	1	0	3	1	2	4	0		

1. Protein TGF- β 1

2. Protein p38MAPK

p38MAPK																						
Preparat	Jumlah (per lapangan pandang 1000x)																				Jumlah	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
B.16	9	15	6	13	17	8	8	6	6	6	7	8	3	8	17	24	7	6	4	13	191	10
B.55	6	8	12	15	50	22	10	12	14	13	11	6	17	25	13	14	12	14	8	7	289	14
B.61	13	15	7	5	9	7	14	9	10	10	13	12	13	15	22	11	50	7	8	8	258	13
B.12	6	11	13	11	8	13	8	8	4	12	7	8	7	6	17	30	20	16	8	8	221	11
B.32	3	1	0	2	3	7	5	2	11	13	11	5	7	4	5	6	6	0	2	0	93	5
B.60	7	5	15	4	6	5	20	8	7	17	3	20	4	6	8	18	3	8	0	0	164	8
B.26	17	16	13	5	5	9	4	8	16	14	7	6	11	12	8	3	2	6	9	4	175	9
B.29	47	8	19	24	19	20	17	23	22	4	4	16	14	18	6	22	17	3	7	10	320	16
B.17	4	1	2	1	6	5	6	10	7	3	4	6	2	3	0	2	2	1	0	0	65	3
B.58	3	5	1	3	1	2	3	2	0	1	0	4	2	1	0	0	7	6	8	2	51	3
B.53	3	4	0	4	3	12	5	10	9	5	8	0	5	8	8	10	7	2	4	6	113	6
B.22	9	7	4	6	6	3	6	24	17	18	20	18	9	17	0	2	0	0	0	0	166	8
B.18	11	2	13	5	17	4	6	10	6	25	9	17	12	7	13	14	15	10	6	22	224	11
B.38	9	19	9	15	10	12	7	6	10	9	13	10	8	12	11	16	13	10	14	9	222	11
B.20	4	7	7	6	10	5	7	9	6	11	12	12	7	14	6	2	4	8	11	8	156	8
B.07	39	13	3	4	4	4	4	1	0	0	1	1	0	4	0	7	7	9	1	0	102	5
B.35	5	8	6	3	5	8	5	7	6	9	10	7	8	10	3	4	3	6	5	11	129	6
B.33	15	4	4	2	0	2	4	7	6	6	0	8	8	7	13	7	7	0	1	1	102	5
B.30	8	7	13	7	12	5	5	4	5	2	6	2	6	3	2	4	5	5	6	2	109	5
B.24	5	7	4	8	6	13	6	20	1	25	10	21	5	3	6	2	6	4	1	2	155	8
B.59	6	8	4	4	9	8	8	8	12	14	13	15	6	3	10	7	6	6	5	5	157	8
B.56	0	2	0	0	0	1	2	1	1	0	3	3	3	0	0	1	1	0	0	0	18	1
B.40	7	35	26	22	15	5	13	28	40	28	14	1	7	2	4	3	0	1	2	0	253	13
B.39	10	3	6	8	17	3	7	4	12	9	11	9	9	7	10	20	6	16	15	9	191	10
B.37	4	11	8	3	5	0	9	6	13	10	13	12	9	16	12	19	8	12	11	7	188	9
B.34	4	7	3	4	2	2	1	10	2	2	5	3	2	7	3	3	2	5	2	4	73	4
B.19	6	7	6	6	6	5	1	4	5	3	11	6	3	19	10	3	2	0	1	0	104	5
B.10	4	1	3	6	2	7	6	8	10	19	13	14	19	9	11	6	16	20	4	5	183	9
B.04	17	18	12	17	7	11	4	7	11	4	3	4	4	7	0	11	3	10	10	15	175	8
B.02	1	0	5	2	2	6	5	0	4	3	6	0	0	0	2	1	1	0	9	3	50	3

Lampiran 2. Hasil Analisis Data

2.1 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

2.1.1 Protein TGF- β 1

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		TGFB1
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4.6667
	Std. Deviation	2.49597
Most Extreme Differences	Absolute	.239
	Positive	.239
	Negative	-.152
Kolmogorov-Smirnov Z		1.307
Asymp. Sig. (2-tailed)		.066

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

2.1.2 Protein p38 MAPK

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		p38MAPK
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7.8333
	Std. Deviation	3.62066
Most Extreme Differences	Absolute	.118
	Positive	.116
	Negative	-.118
Kolmogorov-Smirnov Z		.648
Asymp. Sig. (2-tailed)		.795

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

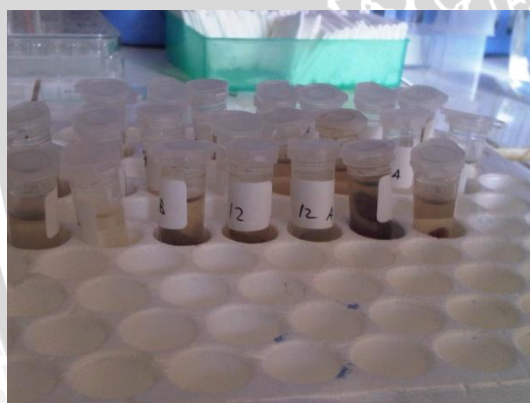
2.2 Uji Korelasi Pearson

Correlations			
		p38MAPK	TGFB1
p38MAPK	Pearson Correlation	1	.482**
	Sig. (2-tailed)		.007
	N	30	30
TGFB1	Pearson Correlation	.482**	1
	Sig. (2-tailed)	.007	
	N	30	30

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 3. Gambar

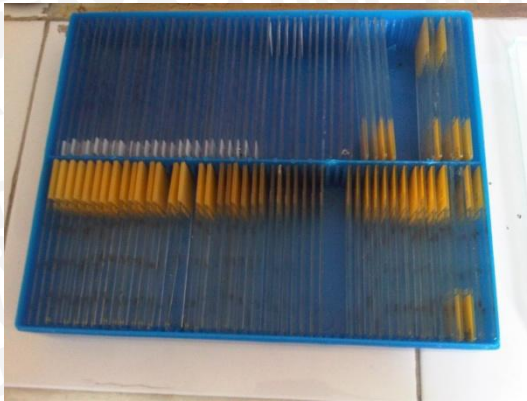
3.1 Pemilihan Jaringan



3.2 Blocking



3.3 Slicing Preparat



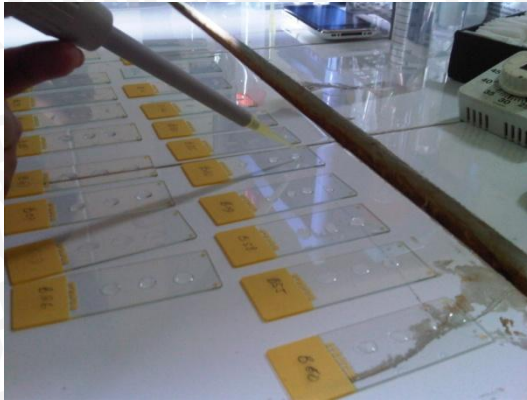
3.4 Inkubasi Preparat



3.5 Deparafinisasi



3.6. Pewarnaan Antibodi Primer



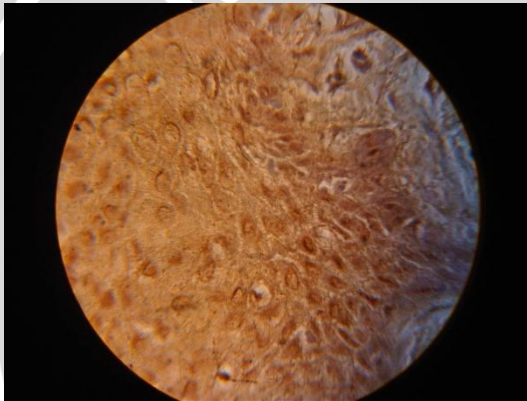
3.7 Pewarnaan Antibodi Sekunder



3.8 Pemasangan Cover Glass



3.9 Pengamatan Dengan Mikroskop Cahaya





PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Erdo Puncak Sidarta

NIM : 105070104121009

Program Studi : Program Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan Tugas Akhir ini jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 15 Desember 2013

Yang membuat pernyataan,

Erdo Puncak Sidarta
NIM. 105070104121009