

DISERTASI

ANALISIS EKSPRESI HUBUNGAN PROTEIN *LEUCINE-RICH REPEATS AND IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1* (LRIG1) DAN EKSPRESI *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR* (EGFR) SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI PADA TIKUS WISTAR DENGAN DISPLASIA NASOFARING YANG DIBERIKAN ISOLATE BETANIN

EXPRESSION ANALYSIS OF *LEUCINE-RICH REPEATS AND IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1* (LRIG1) PROTEIN AND *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR* (EGFR) EXPRESSION WITH HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN WISTAR RATS WITH NASOPHARYNGEAL DYSPLASIA GIVEN BETANIN

**ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI
C013202019**



**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

ANALISIS EKSPRESI HUBUNGAN PROTEIN *LEUCINE-RICH REPEATS AND IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1* (LRIG1) DAN EKSPRESI *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR* (EGFR) SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI PADA TIKUS WISTAR DENGAN DISPLASIA NASOFARING YANG DIBERIKAN ISOLATE BETANIN

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HAHANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI HUBUNGAN PROTEIN LEUCINE-RICH REPEATS
AND IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1 (LRIG1) DAN EKSPRESI
EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGFR) SERTA GAMBARAN
HISTOPATOLOGI PADA TIKUS WISTAR DENGAN DISPLASIA
NASOFARING YANG DIBERIKAN ISOLATE BETANIN**

**EXPRESSION ANALYSIS OF LEUCINE-RICH REPEATS AND
IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1 (LRIG1) PROTEIN AND
EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGFR) EXPRESSION WITH
HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN WISTAR RATS WITH
NASOPHARYNGEAL DYSPLASIA GIVEN BETANIN**

Disusun dan diajukan
Oleh

Anak Agung Ayu Niti Wedayani
C013202019

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 28 November 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Promotor,

Prof.Dr.dr.Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-BKL, SubSp.Rad (K), FICS
Nip. 19630216 198910 1 001

Co. Promotor

Co. Promotor

Dr. dr. Nova A.L. Pieter, Sp.TH-TBKL, Subsp. Onk(K), FICS **dr. Muh. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA(K)**
Nip. 19760408 200212 1 002 Nip. 19770409 200212 1 002

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,

Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001

Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001

ABSTRAK

ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI. *Analisis Ekspresi Hubungan Protein Leucine-Rich Repeats And Immunoglobulin-Like Domains-1 (LRIG1) dan Ekspresi Epidermal Growth Factor (EGFR) serta Gambaran Histopatologi pada Tikus Wistar dengan Displasia Nasofaring yang Diberikan Isolate Betanin* (dibimbing oleh Abdul Qadar Punagir, Nova Audrey Luetta Pieter, dan M. Husni Cangara).

Jutaan orang di seluruh dunia terpapar dengan formaldehida. Formaldehida pada tahap awal mampu merubah struktur sel normal menjadi displasia. Displasia merupakan awal dari sebuah keganasan. Keganasan ini mampu terdeteksi menggunakan biomarker yaitu LRIG1 dan EGFR. Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan ekspresi antara ekspresi LRIG1, ekspresi EGFR, dan gambaran histopatologis pada tikus wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg/200 g BB/hari, 40 mg/200 g BB/hari, 80 mg/200 g BB/hari sehingga memengaruhi prognosis dan dysplasia. Metode yang digunakan ialah eksperimental dengan memberikan isolate betanin pada tikus wistar yang mengalami displasia dengan induksi formaldehid 40 ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perubahan ekspresi LRIG1 sesuai dengan peningkatan dosis betanin yang diberikan. Perubahan tersebut bernilai signifikan dengan $p < 0.05$. Semakin tinggi pemberian dosis betanin maka ekspresi dari LRIG1 akan semakin tinggi. Perubahan ekspresi EGFR bernilai signifikan ($p < 0.05$) dengan pemberian dosis betanin. Semakin tinggi dosis betanin yang diberikan maka ekspresi EGFR akan semakin rendah. Korelasi LRIG1, EGFR dan Gambaran ($p < 0.05$) dengan pemberian dosis betanin. Semakin tinggi dosis betanin yang diberikan maka ekspresi EGFR akan semakin rendah. Korelasi LRIG1, EGFR, dan gambaran histopatologi dengan pemberian dosis isolate betanin terdapat hubungan yang kuat. Nilai p -value $0.001 < 0.05$ menunjukkan terdapat hubungan antara derajat displasia dengan nilai EGFR. Koefisien korelasi antarkedua variabel ini sebesar 0.563 atau 56.3% yang berarti korelasi antar keduanya kuat. Dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara pemberian dosis betanin. Semakin tinggi dosis betanin yang diberikan maka akan semakin rendah derajat displasia dan nilai dari EGFR berbanding terbalik dengan nilai LRIG1.

Kata kunci: LRIG1, EGFR, displasia, formaldehida, betanin, stres oksidatif



ABSTRACT

ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI. *Expression Analysis of Relationship between Leuchine-Rich Repeats and Immunoglobulin-Like Domains-1 (LRIG1), Protein and Epidermal Growth Factor (EGFR) Expression with Histological Features in Wistar Rats with Nasopharyngeal Dysplasia Given Isolate Betanin* (supervised by Abdul Qadar Punagi, Nova Audrey Luetta Pieter and M. Husni Cangara)

The research aims at investigating the expression relationship between the LRIG1 expression, EGFR expression and histopathological Wistar rats with the dysplasia model given the red betanin in the doses of 20 mg/200 gram BW, 40 mg/200 gram BW, 80 mg/200 gram BW, thus affecting the prognosis of dysplasia. Millions of people are exposed to the formaldehyde. The formaldehyde in the early stage can change the normal cell structure into the dysplasia. The dysplasia is the beginning of the malignancy. This malignancy can be detected using the biomarkers, namely LRIG1 and EGFR. This research used the experimental method by administering the isolate Betanin act to the Wistar rats which had the dysplasia by inducing the formaldehyde 40 μ L. The research result indicates that there is the change in the LRIG1 expression according to the increase in the betanin dose given. This change is significant with $p < 0.05$, the higher the betanin dose, the higher the expression of LRIG1. The change in EGFR expression is significant ($p < 0.05$) with the betanin dose given. The higher the betanin dose given, the lower the EGFR expression will be. There is the strong correlation between the LRIG1, EGFR and histopathological features and the betanin isolate dosage. The p-value of 0.001 0.05 indicates that there is the relationship between the dysplasia degree and the EGFR value. The correlation coefficient between these two variables is 0.563 or 56.3%, which means that the correlation between the two is strong. It can be concluded there is the strong relationship between the betanin dose, the higher the betanin dose given, the lower the dysplasia degree, and the value of EGFR. Inversely proportional to the LRIG1 value.

Key words: LRIG1, EGFR, dysplasia, formaldehyde, betanin, oxidative stress





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI
NIM : C013202019
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

ANALISIS EKSPRESI HUBUNGAN PROTEIN *LEUCINE-RICH REPEATS AND IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1 (LRIG1)* DAN EKSPRESI *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)* SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI PADA TIKUS WISTAR DENGAN DISPLASIA NASOFARING YANG DIBERIKAN ISOLATE BETANIN

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 28 November 2023

Yang menyatakan,



ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI

DISERTASI
ANALISIS EKSPRESI HUBUNGAN PROTEIN *LEUCINE-RICH REPEATS AND IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAINS-1* (LRIG1)
DAN EKSPRESI *EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR* (EGFR) SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI PADA TIKUS
WISTAR DENGAN DISPLASIA NASOFARING YANG DIBERIKAN
ISOLATE BETANIN

Disusun dan diajukan oleh
ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI
Nomor Pokok C013202019

Menyetujui

Prof. Dr. dr. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL (K), FICS
Promotor

Dr. dr. Nova Audrey Luetta Pieter, Sp. THT-KL (K)
Kopromotor

dr. M. Husni Cangara, PhD. Sp.PA
Kopromotor

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Anak Agung Ayu Niti Wedayani

Nomor Mahasiswa : C013202019

Program Studi : Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar,
Yang menyatakan

Anak Agung Ayu Niti Wedayani

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa dengan selesainya disertasi ini

Gagasan yang melatari tajuk permasalahan ini timbul dari hasil pengamatan penulis terhadap dampak dari paparan formaldehida pada suatu keganasan.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan disertasi ini, yang hanya berkat bantuan berbagai pihak, maka disertasi ini selesai pada waktunya. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. dr. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL (K), FICS.; Dr. dr. Nova Audrey Luetta Pieter, Sp. THT-KL (K), FICS. dan dr. M. Husni Cangara, PhD. Sp.PA Sebagai Dosen Pembimbing dalam disertasi ini atas bantuan dan bimbingan yang diberikan mulai dari pengembangan minat dari permasalahan ini, pelaksanaan penelitiannya sampai dengan penulisan disertasi ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. dr Hamsu Kadriyan, Sp.THT-KL (K) yang telah banyak membantu dalam penulisan dan metode dalam disertasi ini, serta kepada Prof. Dr. Dra. Erna Kristin, Apt., M.Si. yang telah banyak membantu dalam penulisan disertasi ini, dan yang terakhir ucapan terima kasih juga disampaikan kepada mereka yang Namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Makassar, Januari 2023

Anak Agung Ayu Niti Wedayani

ABSTRAK

ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI. *Analisis Ekspresi Hubungan Protein Leucine-Rich Repeats dan Immunoglobulin-Like Domains-1 (LRIG1) dan Ekspresi Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) serta Gambaran Histopatologi pada Tikus Wistar dengan Displasia Nasofaring yang Diberikan Isolate Betanin* (dibimbing oleh Prof. Dr. dr. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL (K), FICS.; Dr. dr. Nova Audrey Luetta Pieter, Sp. THT-KL (K), FICS dan dr. M. Husni Cangara, PhD. Sp.PA)

Jutaan orang di seluruh dunia terpapar dengan formaldehida. Formaldehida pada tahap awal mampu merubah struktur sel normal menjadi displasia. Displasia merupakan awal dari sebuah keganasan. Keganasan ini mampu terdeteksi menggunakan biomarker yaitu LRIG1 dan EGFR. Keduanya memiliki sifat yang berkebalikan. LRIG1 merupakan supresor keganasan dan EGFR merupakan gen yang pro terhadap keganasan. Pemberian betanin mampu menekan *stress* oksidatif sehingga memengaruhi ekspresi dari kedua biomarker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi antara ekspresi LRIG1, ekspresi EGFR dan gambaran histopatologis pada tikus wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari, sehingga memengaruhi prognosis dari displasia.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan memberikan isolate Betanin pada tikus wistar yang mengalami displasia dengan induksi formaldehid 40 mL.

Hasil dari penelitian ini adalah terdapat perubahan ekspresi LRIG1 sesuai dengan peningkatan dosis betanin yang diberikan. Perubahan tersebut bernilai signifikan dengan $p < 0,05$, pemberian dosis betanin semakin tinggi maka ekspresi dari LRIG1 akan semakin tinggi. Perubahan ekspresi EGFR bernilai signifikan ($p < 0,05$) dengan pemberian dosis betanin. Semakin tinggi dosis Betanin yang diberikan maka ekspresi EGFR akan semakin rendah. Korelasi LRIG1, EGFR dan gambaran histopatologi dengan pemberian dosis isolate Betanin terdapat hubungan yang kuat. Nilai $p\text{-value}$ $0.001 < 0,05$ menunjukkan terdapat hubungan antara derajat displasia dengan nilai EGFR. Koefisien korelasi antar kedua variabel ini sebesar 0.563 atau 56.3% yang berarti korelasi antar keduanya kuat. Lebih jauh, hasil penelitian juga menunjukkan terdapat hubungan yang kuat antara pemberian dosis betanin dengan EGFR, di mana semakin tinggi dosis betanin yang diberikan maka akan semakin rendah derajat displasia dan nilai dari EGFR. Sementara itu, pemberian dosis betanin yang tinggi berbanding terbalik dengan nilai LRIG1.

Kata kunci : LRIG1, EGFR, displasia, formaldehida, betanin, *stress* oksidatif

ABSTRACT

ANAK AGUNG AYU NITI WEDAYANI. *Expression Analysis of Leucine-Rich Repeats and Immunoglobulin-Like Domains-1 (LRIG1) Protein and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression with Histological Features in Wistar Rats with Nasopharyngeal Dysplasia Given Isolate Betanin* (supervised by Prof. Dr. dr. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL (K), FICS.; Dr. dr. Nova Audrey Luetta Pieter, Sp. THT-KL (K), FICS and dr. M. Husni Cangara, PhD. Sp.PA

Millions of people are exposed to formaldehyde. Formaldehyde at early stage can change the normal cell structure into dysplasia. Dysplasia is the beginning of a malignancy. This malignancy can be detected using biomarkers, namely LRIG1 and EGFR. Both have opposite function. LRIG1 is a suppressor of malignancy and EGFR is a gene that is pro against malignancy. Giving betanin can suppress oxidative stress thereby affecting the expression of the two biomarkers.

This study aims to determine the relationship between LRIG1 expression, EGFR expression and histopathological features in Wistar mice with a dysplasia model that were given betanin isolate at a dose of 20 mg/200 g BW/day, 40 mg/200 g BW/day, 80 mg/200 g BW /day, thus affecting the prognosis of dysplasia.

This research used an experimental method by administering isolate Betanin act to Wistar Rats which had dysplasia by inducing formaldehyde 40 mL.

The results of this study were that there were changes in LRIG1 expression according to the increase in Betanin dose given. This change was significant with $p < 0.05$, the higher the betanin dose, the higher the expression of LRIG1. Changes in EGFR expression was significant ($p < 0.05$) with betanin dosing. The higher the Betanin dose given, the lower the EGFR expression will be. There is a strong correlation between LRIG1, EGFR and histopathological features with the dosage of Betanin isolate. A p-value of $0.001 < 0.05$ indicates that there is a relationship between the degree of dysplasia and the EGFR value. The correlation coefficient between these two variables is 0.563 or 56.3%, which means the correlation between the two is strong. Furthermore, the results of the study also show that there is a strong relationship between administration of the betanin dose and EGFR, where the higher the dose of betanin given, the lower the degree of dysplasia and the value of the EGFR. Meanwhile, giving a high dose of betanin was inversely proportional to the LRIG1 value.

Keyword : LRIG1, EGFR, dysplasia, formaldehyde, betanin, oxidative stress

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....	8
PRAKATA	9
ABSTRAK	10
DAFTAR TABEL	15
Halaman.....	15
DAFTAR GAMBAR	16
DAFTAR LAMPIRAN	19
Halaman.....	19
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN.....	20
BAB I PENDAHULUAN	22
1.1. Latar Belakang.....	22
1.2. Rumusan Masalah	32
1.3. Tujuan:.....	33
1.3.1 Tujuan Umum	33
1.3.2 Tujuan Khusus	33
1.4. Hipotesis:	34
1.5. Manfaat.....	34
1.5.1 Manfaat Bagi Pengembangan Ilmu	34
1.5.2 Manfaat Aplikasi.....	35
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	36
2.1 Displasia.....	36
2.2 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	52
2.3 Betanin.....	62
2.4 Vitamin C	70
2.5 Dampak Induksi Formaldehida.....	73
2.6 Hubungan Displasia Nasofaring, LRIG1 dan EGFR	78
2.7 Kerangka Teori.....	81
2.8 Landasan Teori	81
2.9 Kerangka Konseptual	84
BAB III: METODE PENELITIAN	85
3.1 Metode Penelitian	85
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	87

3.2.1	Populasi	87
3.2.2	Sampel	87
3.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	88
3.3.1	Kriteria Inklusi	88
3.3.2	Kriteria Eksklusi	88
3.4	Variabel Penelitian	88
3.4.1	Variabel bebas	88
3.4.2	Variabel Terikat	88
3.5	Definisi operasional	89
3.6	Materi/Bahan dan Alat Penelitian	91
3.6.1	Materi/ Bahan	91
3.6.2	Alat	92
3.7	Prosedur Penelitian	93
3.7.1	Proses Penyiapan Kandang	93
3.7.2	Pembuatan Pakan Tikus	95
3.7.3	Pengenceran Isolat Betanin	95
3.7.4	Pembuatan Larutan Formaldehida	96
3.7.5	Pengambilan Sampel Darah Sebelum diinduksi dan diberikan Perlakuan	96
3.7.6	Proses Induksi dan Pemberian Perlakuan	97
3.7.7	Proses Pengumpulan Sampel Darah dan Organ	97
3.7.8	Proses Pembuatan Preparat Gambaran Histopatologi	98
3.7.9	Proses Pemeriksaan LRIG1 dan Egf dengan ELISA	100
3.8	Proses Analisis Data	102
3.9	Alur Penelitian	105
3.10	Jadwal Penelitian	106
BAB IV: HASIL DAN PEMBAHASAN		108
4.1	Data Hispatologi	108
4.1.1	Deskripsi Data	108
4.1.2	Uji Beda Derajat Displasia Setiap Kelompok	113
4.1.3	Hasil Uji Beda Derajat Displasia Setiap Kelompok pada Nasofaring	113
4.1.4	Pembahasan Hasil Derajat Displasia setelah diberikan perlakuan	114
4.2	Data LRIG1 dan EGFR	117

4.2.1 Deskripsi Data LRIG1 dan EGFR	117
4.2.2 Uji Normalitas Data	121
4.2.3 Uji Beda Menggunakan Nonparametrik Kruskal-Wallis.....	122
4.2.4 Uji Post-Hoc	123
4.2.5 Kesimpulan	131
4.3 Uji Korelasi LRIG1, EGFR dan Hubungannya dengan Gambaran Histopatologi	137
4.3.1 Pembahasan LRIG1, EGFR dan Hubungannya dengan Gambaran Histopatologi	139
BAB V: KESIMPULAN DAN SARAN	145
DAFTAR PUSTAKA.....	147
LAMPIRAN	158

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1. Grading displasia (Nayak, Govind and Jena, 2019)	39
Tabel 2.2. Informasi Antigen LRIG1 (The Human Protein Atlas, 2022).....	45
Tabel 3.1. Jadwal Penelitian	106
Tabel 4.1. Hasil uji Chi-Square data hispatologi nasofaring.....	114
Tabel 4.2. Deskripsi rata-rata data LRIG1 dan EGFR pada setiap lapisan.....	119
Tabel 4.3. Deskripsi data LRIG1 dan EGFR untuk setiap perlakuan	120
Tabel 4.4. Hasil uji normalitas data LRIG1 dan EGFR pada lapisan mukosa	121
Tabel 4.5. Hasil uji beda nonparametrik data EGFR pada lapisan mukosa	122
Tabel 4.6. Hasil uji beda nonparametrik data EGFR pada lapisan mukosa	123
Tabel 4.7. Uji post-hoc lapisan mukosa LRIG1	123
Tabel 4.8. Uji post-hoc lapisan mukosa EGFR	131
Tabel 4.9. Hasil uji korelasi	138

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Displasia Ringan (Speight, 2007).....	37
Gambar 2.2. Displasia Sedang (Speight, 2007).....	37
Gambar 2.3. Displasia Berat (Speight, 2007)	38
Gambar 2.4. Carcinoma In Situ (Speight, 2007)	39
Gambar 2.5. Perubahan Normal Mukosa Hiperplasia menjadi Displasia, Carcinoma in situ hingga Invasive Carcinoma (Johnson et al., 2020).....	40
Gambar 2.6. Lingkungan memengaruhi kejadian keganasan pada kepala dan leher (HNSCC) (Johnson et al., 2020)	41
Gambar 2.7. Infeksi HPV terhadap transformasi epitel normal (Johnson et al., 2020).....	42
Gambar 2.8. Paparan karsinogen dan Infeksi EBV berpengaruh terhadap perubahan Normal Nasopharyngeal Epithelium menjadi metastasis dengan melalui tahapan low-grade displasia, High-grade displasia dan Invasive Carcinoma (Chan, Teo and Johnson, 2002)	43
Gambar 2.9. LRIG1 Banyak ditemukan di Sitosol (The Human Protein Atlas, 2022).....	45
Gambar 2.10. Antigen Informasi dari LRIG1 (The Human Protein Atlas, 2022)	46
Gambar 2.11. Struktur dari LRIG. Terdapat 5 anggota dari LRIG Family human LRIG1, LRIG2, LRIG3, Drosophila Lambik dan Caenorhabditis elegans Sma-10 (Simion, Cedano-Prieto and Sweeney, 2014).....	46
Gambar 2.12. Perubahan dari Fungsi Biologi terkait oleh Biomarker yang teridentifikasi pada Genetic Pasien dengan Kanker Nasofaring (Islam et al., 2022).....	50
Gambar 2.13. Imunohistokimia dari LRIG1 pada jaringan NSCLC pada gambar A menggambarkan tidak adanya LRIG1 pada nucleus, B. mild, C.moderate, D. High ekspresi (An et al., 2015)	51
Gambar 2.14. IHC konsentrasi LRIG1 pada colorectal cancer dengan berbagai perbesaran Gambar A. adalah dengan perbesaran x10 dan Gambar B adalah dengan perbesaran x 100 (Bakherad et al., 2021).....	52
Gambar 2.15. Skema mutasi pada EGFR pada glioblastoma, kanker paru – paru dan kanker kolorektal (Sigismund, Avanzato and Lanzetti, 2018)	54
Gambar 2.16. Struktur dari EGFR (Nair, Bonner and Bredel, 2022)	56
Gambar 2.17. CTX dan EGF berikatan pada sel normal. Mutasi pada ECD pada EGFR di sel kanker (Nair, Bonner and Bredel, 2022)	56
Gambar 2.18. Mutasi dari EGFR A. copy EGFR, B. pada mRNA C.pada protein, D. genome aneuploidy, E. mutasi terjadi lebih banyak (Nair, Bonner and Bredel, 2022)	57
Gambar 2.19. Struktur kristal dari kompleks EGF – EGFR (Ogiso et al., 2002)	59
Gambar 2.20. MAPK/ERK pathway. EGF berikatan dengan Epidermal Growth Factor Receptor pada permukaan, ikatan tersebut menginduksi dimerisasi.....	60

Gambar 2.21. Struktur betanin.....	64
Gambar 2.22. Betanin sebagai antioksidan memengaruhi Nrf2/Are/Foxo1 pathway (Yu et al., 2021)	65
Gambar 2.23. Mekanisme betanin dalam proses apoptosis (Hadipour et al., 2020).....	68
Gambar 2.24. Mekanisme betanin sebagai antioksidan dalam stress oksidatif (Phukan et al., 2023).....	69
Gambar 2.25. Mekanisme kerja Vitamin C sebagai antioksidan dalam Keap1-Nrf2 pathway (Ngo and Duennwald, 2022)	72
Gambar 2.26. Mekanisme Vitamin C sebagai antioksidan termasuk Peroxiredoxin (PRDX), glutathione peroxidase (GPX) dan catalase (CAT) pada Sitosol atau mitokondria yang melakukan hidrolisis dari H ₂ O ₂ menjadi H ₂ O (Huang et al., 2022)	72
Gambar 2.27. Mayor oxidant dan antioksidan sistem pada keganasan (Liu et al., 2023).....	73
Gambar 2.28. Ekspresi dari Immunohistochemistry (IHC) LRIG1 dan EGFR pada human gastric preneoplastic dan jaringan kanker (Yu et al., 2018)	78
Gambar 2. 29. Kerangka teori.....	81
Gambar 2.30. Kerangka konseptual	84
Gambar 3.1. Klasifikasi derajat Dysplasia menurut WHO (2005).....	90
Gambar 3.2. Kandang tikus yang digunakan dalam proses induksi displasia	95
Gambar 3.3. Alur penelitian	105
Gambar 4.1. Nasofaring pada kelompok sehat.....	108
Gambar 4.2. Nasofaring pada kelompok kontrol negatif	109
Gambar 4.3. Nasofaring pada kelompok kontrol positif	109
Gambar 4.4. Nasofaring perlakuan 1 dosis Isolate betanin 20 mg /200gr BB <i>Rattus Norvegicus</i> / hari.....	110
Gambar 4.5. Nasofaring perlakuan 2 dosis isolate betanin 40 mg/ 200gr BB <i>Rattus Norvegicus</i> / hari.....	110
Gambar 4.6. Nasofaring perlakuan 3 dosis isolate betanin 80 mg/ 200gr BB <i>Rattus Norvegicus</i> / hari.....	111
Gambar 4.7. Data derajat displasia nasofaring setiap kelompok perlakuan.....	111
Gambar 4.8. Imunohistokimia LRIG1 nasofaring pada kelompok perlakuan 2 (isolate betanin 40 mg/200 gram BB <i>Rattus norvegicus</i> / hari)	126
Gambar 4.9. Imunohistokimia LRIG1 nasofaring pada kelompok perlakuan 3 (isolate betanin 80 mg/200 gram BB <i>Rattus norvegicus</i> / hari)	127
Gambar 4.10. Imunohistokimia EGFR kelompok kontrol sehat	128
Gambar 4.11. Imunohistokimia EGFR kelompok kontrol negative	128
Gambar 4.12. Imunohistokimia EGFR kelompok kontrol positif	129
Gambar 4.13. Imunohistokimia EGFR kelompok Imunohistokimia EGFR kelompok perlakuan 1 (dosis isolate betanin 20 mg/200 gram BB <i>Rattus norvegicus</i> / hari)	129
Gambar 4.14. Imunohistokimia EGFR kelompok Imunohistokimia EGFR kelompok perlakuan 2 (dosis isolate betanin 40 mg/200 gram BB <i>Rattus norvegicus</i> / hari)	130

Gambar 4.15. Imunohistokimia EGFR kelompok perlakuan 3 (dosis isolate betanin 80 mg/200 gram BB <i>Rattus norvegicus</i> / hari).....	130
Gambar 4.16. Variasi <i>pathway</i> pada <i>stress</i> oksidatif (Chandrasekaran dan Madanagopalan, 2021)	143

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Ethical Clearance	158
Lampiran 2. Case Report Form.....	159
Lampiran 3. Hasil Analisis Data Displasia.....	162
Lampiran 4. Hasil Analisis LRIG1 dan EGFR	165

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang dan Singkatan	Arti Lambang dan Singkatan
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ANXA1	<i>Annexin A1</i>
BARF1	<i>BamHI-A rightward frame 1</i>
BART-miRNAS	<i>BamHI fragment H rightward open reading frame 1 - Micro ribonucleic acids</i>
BARTs	<i>BamHI fragment A rightward tran- scripts</i>
CBR3	<i>carbonyl reductase 3</i>
CCND1	<i>cyclin D1</i>
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CLASP1	<i>cytoplasmic linker associated protein 1</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DCTN1	<i>dynactin subunit 1</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPC	<i>DNA-protein crosslink</i>
DPPH	<i>Difenil hidrazil</i>
EBV	<i>Epstein–Barr virus</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMP	<i>Epithelial Membrane Protein</i>
EMT	<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>
ERK	<i>extracellular regulated MAP kinase</i>
FND3B	<i>fibronectin type III domain B</i>
GRM4	<i>glutamate metabotropic receptor 4</i>
H2CO	<i>Formaldehyde</i>
HDLBP	<i>High Density Lipoprotein Binding Protein</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC50	<i>inhibitory concentration 50</i>
Ig	<i>imunoglobulin</i>
IHC	<i>immunohistochemical</i>
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
KNF	<i>Kanker Nasofaring</i>
LRIG1	<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains -1</i>
LRIG2	<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains -2</i>
LRIG3	<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains -3</i>
LRRs	<i>leucine-rich repeats</i>
MAPK	<i>mitogen activated kinase-like protein</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation -7</i>

MDA	<i>malondialdehyd</i>
MEK 1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MET	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>
microRNAs	<i>Micro ribonucleic acids</i>
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
MLO	<i>mieloperoksidase</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
NSLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
p53	<i>Tumor Protein 53</i>
PAK 1	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK</i>
pH	<i>potential of hydrogen</i>
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
POLR2M	<i>RNA Polymerase II Subunit M</i>
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
Raf 1	<i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
RET	<i>tyrosine-protein kinase receptor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Real time- Polymerase chain reaction</i>
Sma-10	<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein sma-10</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
SPEM	<i>Spasmolytic polypeptide-expressing metaplastic</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T-reg	<i>T-regulatory</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TWA	<i>Time Wiegthed average</i>
WNKI	<i>WNK Lysine Deficient Protein Kinase 1</i>
YBX3	<i>Y-box binding protein 3</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan prevalensi keganasan nasofaring yang cukup banyak. Keganasan seperti kanker menjadi salah satu permasalahan kesehatan di Indonesia bahkan di dunia (Solikhah, Perwitasari and Rejeki, 2022). Prevalensi kanker di Indonesia pada tahun 2019 menyentuh angka 270 ribu dari total populasi di Indonesia. Angka kejadian kanker bervariasi tergantung letaknya. Sebagai contoh pada tahun 2019, kanker nasofaring memiliki persentase insidensi sebanyak 5,2% dari total penderita kanker di Indonesia. Persentase insidensi ini disertai dengan tingkat mortalitas yang linear juga, sebanyak 5,4% dari total populasi kanker di Indonesia (World Health Organization, 2020).

Keganasan mampu timbul akibat adanya perubahan struktur pada sel normal. Perubahan struktur pada sel normal dipengaruhi oleh banyak faktor (Alhmoud et al., 2020). Secara sederhana, perubahan struktur sel normal menjadi tidak normal dimulai dari hiperplasia, displasia, hingga menjadi *carcinoma in situ* (keganasan) (Miller and Zachary, 2017). Perubahan ini mampu diakibatkan oleh faktor zat kimia. Salah satu paparan zat kimia yang bersifat karsinogenik adalah formaldehida (Adamović et al., 2021).

Jutaan orang di seluruh dunia terpapar dengan formaldehida (Zhang *et al.*, 2018). Hal ini dikarenakan manusia berinteraksi setiap harinya dengan barang – barang yang mengandung formaldehida. Formaldehida adalah zat yang mampu merusak struktur sel, karena memiliki efek iritan dan karsinogenik. Keganasan yang sering terjadi akibat formaldehida secara inhalasi adalah karsinoma nasofaring dan keganasan pada saluran pernafasan. Formaldehida sering ditemukan sebagai disinfektan dan pembersih lantai. Formaldehida juga terkandung didalam pengawet dan dalam industri misalnya pelapis kayu atau karpet. (Swenberg *et al.*, 2013; Clausen *et al.*, 2020)

Secara alamiah, formaldehida dapat ditemukan secara endogen melalui metabolisme seluler yang normal. Salah satu sumber biosintetik dari formaldehida adalah metabolisme metanol, sebagai produk intermediate (Abdollahi and Hosseini, 2014). Sumber lainnya dari formaldehida endogenik adalah metabolisme *L-methionine*, histamin, dan *methyl alanine*, yang membuat formaldehida menjadi kunci intermediate penting untuk biosintesis dari purin dan asam amino lainnya. Formaldehida juga diproduksi melalui demetilasi oksidatif enzimatis dari DNA, RNA, dan Protein. Formaldehida endogen berlimpah dalam tubuh kita, sekitar 100 μM dalam kondisi normal (Nakamura *et al.*, 2017a; Li *et al.*, 2021). Tingkat formaldehida yang tinggi dapat disebabkan karena reaksi enzimatis berupa reaksi demetilasi atau deaminasi oksidatif dan *mieloperoksidase* (MLO) (Bernardini *et al.*, 2022). Neutrofil teraktivasi akan menginduksi reaksi MLO

yang menghasilkan formaldehida sebagai produk sampingannya. (Nakamura *et al.*, 2017b).

Formaldehida dapat menyebabkan beberapa dampak buruk dengan menciptakan jejas pada beberapa jaringan, merusak regulasi metabolisme energi, dan mengurangi kapasitas antioksidan tubuh (Zhang *et al.*, 2018). Hal ini berkaitan dengan sifat formaldehida yaitu genotoksik dan sitotoksik. Sifat formaldehida ini menyebabkan kerusakan pada *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan perubahan kromosom. Paparan formaldehida dapat meningkatkan ketidakstabilan genom sehingga mampu meningkatkan risiko keganasan pada saluran pernafasan (Kawanishi, Matsuda and Yagi, 2014; Kang *et al.*, 2021a). Kecurigaan terhadap efek karsinogenik formaldehida dimulai dari penemuan awal tumor nasal pada hewan coba yang terpapar formaldehida. Bukti lain yang mendukung kecurigaan terdapat pada penelitian sebelumnya yang menyatakan adanya korelasi peningkatan insidensi tumor dan proliferasi sel yang dependen terhadap peningkatan konsentrasi dari formaldehida (Swenberg *et al.*, 2013). *International Agency for Research on Cancer* (IARC) menyimpulkan bahwa hasil komprehensif dari studi skala besar tentang formaldehida pada manusia dan hewan coba dapat menyebabkan keganasan pada nasofaring dan keganasan pada sinonasal (Kang *et al.*, 2021b).

Formaldehida dapat bereaksi secara langsung dengan DNA dan menyebabkan peningkatan pada kerusakan DNA, pertukaran sister kromatid, pembentukan mikronukleus pada sel, serta kelainan-kelainan

kromosomal yang terlihat pada limfosit perifer dan mukosa nasal. Polimorfisme genetik pada gen-gen yang berkaitan dengan metabolisme dan perbaikan DNA menjadi faktor yang dapat diasosiasikan dengan meningkatnya kerusakan genetik pada subjek-subjek yang terpapar formaldehida. Paparan formaldehida juga dapat menyebabkan terjadinya induksi *DNA-protein crosslink* (DPC) pada sel darah putih dan sel epitel nasal, dimana DPC pada sel darah putih teramati lebih tinggi pada pekerja yang terpapar formaldehida (Kawanishi, Matsuda and Yagi, 2014; Ghelli *et al.*, 2021). *DNA-protein crosslink* sendiri merupakan bagian dari proses karsinogenesis, yang merupakan tahapan lesi awal dan menjadi biomarker dari paparan terhadap formaldehida. (Kang *et al.*, 2021b).

Formaldehida pada tahap awal mampu merubah struktur sel normal menjadi displasia. Displasia adalah terjadinya perubahan struktur seluler hingga jaringan. Perubahan terjadi mulai dari variasi dari ukuran nukleus dan bentuknya, misalnya menjadi *anisonucleosis* dan *pleomorphosim*, peningkatan dari rasio *citoplasma*, peningkatan dari mitosis dan peningkatan dari jumlah dan ukuran dari nukleus. Perubahan dari normal mukosa diawali dengan hiperplasia kemudian displasia dan menjadi *carcinoma in situ* hingga menjadi *invasive carcinoma*. Displasia mampu dijadikan sebagai tanda suatu jaringan memiliki risiko tinggi untuk menjadi karsinoma yang invasif. Displasia dapat dikenali dengan hilangnya keseragaman antara sel-sel individual pada orientasi arsitekturalnya. Sel-sel displasia memperlihatkan pleomorfisme dan sering memiliki nukleus

yang besar dan hiperkromatik. Sel-sel yang terlihat dalam proses mitosis terlihat lebih banyak dibandingkan biasa dan frekuensi penampakkannya lebih tinggi pada lokasi-lokasi yang tidak biasa pada epitel. Pada epitel skuamosa berlapis yang bersifat displastik mitosis tidak hanya terjadi pada lapisan basal yang merupakan tempat seharusnya di mana proses mitosis dan pembaruan jaringan terjadi. Proses mitosis dapat terlihat di keseluruhan epitel. Salah satu contohnya adalah perubahan seperti sel-sel tinggi yang biasanya akan berdiferensiasi menjadi sel-sel pipih pada bagian permukaan dapat hilang dan tergantikan oleh sel-sel basal yang terlihat gelap (Miller and Zachary, 2017). Displasia merupakan fase pra-kanker, juga dapat menjadi tanda displasia seringkali berada di samping neoplasma yang bersifat malignan. Displasia yang bersifat *mild* atau moderat yang tidak sampai melibatkan seluruh ketebalan dari epitel memiliki kesempatan untuk beregresi (Kumar, Abbas dan Aster, 2017).

Derajat keparahan displasia diukur menggunakan istilah *grade* dari displasia epitelial. Penilaian dari *grade* displasia adalah suatu hal yang penting bagi ahli patologi untuk dilakukan secara akurat sehingga risiko transformasi malignansi dapat diprediksi lebih awal, dan diagnosis dengan tepat dapat ditegakkan sehingga perawatan yang tepat dan cepat pun dapat diimplementasikan (Leeky *et al.*, 2015). Diagnosis mampu ditegakkan dengan melihat gambaran histologis dari jaringan. Karakteristik yang dilihat meliputi hal seperti stratifikasi epitelial ireguler, hilangnya polaritas sel basal, anisonukleosis, pleomorfisme nukleus, hiperkromasia, dan

karakteristik lainnya (Gupta, Jawanda and Madhushankari, 2020). Ketika suatu perubahan displasia parah dan meliputi keseluruhan dari ketebalan epitel, maka lesi ini dapat dikategorikan sebagai *carcinoma in situ*, yang merupakan stase preinvasif dari kanker (Kumar, Abbas dan Aster, 2017).

Salah satu contoh karsinoma yang sering terjadi akibat paparan zat kimia adalah karsinoma nasofaring. Karsinoma nasofaring adalah keganasan kepala leher yang paling sering terjadi. Karsinoma nasofaring berasal dari epitel nasofaring dan terletak di *Fossa Rossenmuller* pada posteromedial dari tuba Eustachius. Karsinoma nasofaring yang berawal dari displasia dari epitel di nasofaring memiliki beberapa tipe yaitu tipe I karsinoma sel skuamosa non keratin, tipe II bersifat mempertahankan bentuk sel epitel dan pola pertumbuhan dan karsinoma yang tidak berdiferensiasi, serta tipe III yang bersifat tidak mempertahankan pola pertumbuhan atau bentuk khas dari sel (Shah dan Nagalli, 2022).

Faktor risiko yang dapat meningkatkan angka kejadian karsinoma nasofaring menurut Kementerian Kesehatan RI adalah berjenis kelamin laki-laki, ras Asia dan Afrika Utara, umur 30-50 tahun, sering mengonsumsi makanan yang diawetkan, paparan terhadap formalin atau formaldehida, infeksi virus Epstein Barr, riwayat keluarga, faktor Gen HLA, merokok dan minum minuman mengandung alkohol. Paparan dari formaldehida merupakan salah satu dari penyebab karsinoma nasofaring (Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2019).

Lingkungan memengaruhi kejadian keganasan salah satunya adalah polutan udara yang dapat mengaktivasi *carcinogen metabolic*. Paparan formaldehida secara berlebih dan terus - menerus akan dikonversi menjadi asam format yang meningkatkan keasaman darah sehingga menyebabkan tarikan nafas menjadi pendek dan sering, hipothermi, pusing, sukar menelan, sakit perut akut disertai dengan muntah - muntah, mata kering, dan hidung kering hingga berdarah (Adamović *et al.*, 2021). Dalam bentuk oral dosis tinggi, formaldehida akan menimbulkan kejang, hematuri, hematopoesis dan kematian. Bentuk injeksi formaldehida dengan dosis 100 gr juga mampu berakibat fatal seperti kematian (Chandra and Prasad, 2020). Catatan dari *U.S. National Library of Medicine and Toxicology* melaporkan bahwa dalam waktu panjang, paparan formaldehida di udara pada manusia mampu menyebabkan iritasi kulit, mata, hidung dan tenggorokkan (Adamović *et al.*, 2021). Secara mikroskopik paparan formaldehida dalam jangka panjang juga akan memengaruhi gambaran histopatologis dan pada laporan beberapa organisasi internasional telah menetapkan formaldehida sebagai karsinogen terhadap manusia (Razi *et al.*, 2013).

Bahan karsinogen berpotensi menyebabkan perubahan struktur sel yang mengarah pada displasia. Seiring dengan perkembangan teknologi, organ yang mengalami displasia mampu dilihat ekspresi gennya dengan menggunakan biomarker untuk keperluan yang lebih detail. Salah satu biomarker yang dapat dinilai sebagai awal timbulnya perubahan struktur

atau keganasan adalah *Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains* (LRIG)-1 dan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Wang, Poulin and Coffey, 2013; Chen et al., 2021).

Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains (LRIG)-1 dan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) adalah marker gen yang berkaitan dengan kanker. *Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1* adalah tipe 1 transmembran yang terdiri dari 15 *leucine-rich repeats* (LRRs) dan 3 imunoglobulin (Ig) like domains. *Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1* berasal dari keluarga gen LRIG, yang terletak pada kromosom 3p14,1p13.1 dan 12q14.1, sedangkan *Epidermal growth factor receptor* termasuk dalam *reseptor tyrosin kinase*. Selain fungsi LRIG1 sebagai supresor tumor, EGFR juga berperan penting dalam pengaturan proliferasi sel tumor. Aktivasi EGFR terjadi apabila ligan berikatan dan EGFR teraktivasi. Hasil dari aktivasi ini adalah fosforilasi dan aktivasi berbagai sinyal, contohnya diferensiasi sel, proliferasi, dan karsinogenesis. Beberapa penelitian melaporkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi EGFR yang abnormal pada kanker nasofaring (Chen et al., 2021)

Kedua marker gen saling berkaitan namun memiliki fungsi yang bertolak belakang. *Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1* adalah protein transmembrane yang bersifat antagonis dengan EGFR. *Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1* mereduksi EGFR dengan menambahkan *ubiquitylasi* pada reseptor serta mendegradasi

lisosom. Biomarker ini juga diasosiasikan dengan reseptor *tyrosine kinase mesenchymal-epithelial transition* (MET). Kadar ekspresi LRIG1 yang tinggi memiliki korelasi yang signifikan terhadap *survival* pasien dengan keganasan. Ekspresi dari LRIG1 dapat digunakan untuk melihat prognosis suatu kanker dan merupakan supresor gen pada berbagai macam keganasan termasuk keganasan pada payudara, keganasan pada colorectal, dan keganasan pada bladder. Pada beberapa penelitian mengungkapkan LRIG1 dan EGFR terdeteksi secara bersamaan pada suatu keganasan. Penelitian yang dilakukan oleh Powel, dkk (2012) menyatakan LRIG1 tidak ada pada intestinal adenoma yang berkembang.

Prevalensi keganasan yang bertambah setiap tahunnya menjadikan keganasan ini sebagai urgensi yang perlu untuk dicegah dengan upaya yang optimal. Upaya pencegahan dapat dilakukan dengan berbagai cara. Salah satu pilihan upaya pencegahannya adalah dengan mengonsumsi bahan alami. Salah satu contohnya adalah mengonsumsi buah, umbi atau sayuran yang mengandung antioksidan (Farvid *et al.*, 2016).

Upaya mencegah displasia pada jaringan yang disebabkan oleh paparan polutan inhalasi, seperti formaldehida, dapat ditemukan di senyawa alami berupa betanin. Contoh buah yang memiliki kadar betanin adalah buah naga merah dan umbi ungu. Kandungan Betanin secara signifikan menghambat produksi ROS, neutrofil, dan mengurangi kerusakan DNA pada sel yang diaktifkan. Dengan menghambat produksi

ROS yang terbentuk dari formaldehida diharapkan mampu mencegah displasia dan memengaruhi kadar ekspresi dari LRIG1 yang merupakan Gen *suppressor* tumor dan EGFR yang bersifat berkebalikan dari LRIG1. Bahaya pada formaldehida disebabkan karena formaldehida memiliki gugus karbonil yang dapat dengan mudah bereaksi dengan gugus -NH₂ yang menyebabkan proses oksidatif fosforilasi terganggu, yang mampu menyebabkan asidosis dan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga terjadi peningkatan produksi radikal bebas. Radikal bebas adalah atom atau molekul dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan bersifat tidak stabil, berumur pendek dan sangat reaktif untuk penarikan elektron molekul lain dalam tubuh untuk mencapai stabilitas yang mampu menyebabkan kerusakan pada biomolekul (Phaniendra, Jestadi and Periyasamy, 2015). *Reactive oxygen species* mampu merusak membran sel dari makromolekul, peroksidasi lipid, dan merupakan suatu reaksi berantai dimana radikal bebas mengikat elektron dari lipid dalam membran sel. Senyawa ini bereaksi dengan asam arakidonat yang merupakan *polyunsaturated omega-6 fatty acid* yang terdapat di dalam membran sel. Peningkatan peroksidasi lipid ini akan menyebabkan *stress* oksidatif. *Stress* oksidatif adalah awal dari kerusakan sel tubuh, penuaan dini, hingga keganasan. Untuk mencegah terjadinya akumulasi radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker, diperlukan senyawa antioksidan untuk menetralkan menurunkan dan menghambat pembentukan radikal bebas sehingga menjadi elektron bebas dan menghentikan kerusakan tubuh.

Antioksidan adalah senyawa yang mampu mencegah *stress* oksidatif sehingga mampu menurunkan kerusakan pada sel tubuh (Arnanda and Nuwarda, 2019). Betanin memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dan stabil. Pada penelitian yang dilakukan Widianingsih (2016) mengatakan bahwa betanin memiliki aktivitas antioksidan tinggi yaitu kurang dari 200 ppm dan dapat digunakan sebagai antioksidan untuk mencegah displasia sebagai fase awal dari sebuah keganasan.

Berdasarkan latar belakang tersebut Penelitian ini diharapkan dapat membuktikan dengan pemberian secara oral isolate betanin dapat menjadi preventif terjadinya displasia yang disebabkan oleh induksi formaldehida dengan menghambat produksi ROS, sehingga mampu meningkatkan kadar LRIG1 dan menurunkan kadar EGFR yang merupakan biomarker dari suatu keganasan yang memiliki sifat berkebalikan.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat perubahan ekspresi LRIG1 pada Tikus Wistar model displasia diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari?
2. Apakah terdapat perubahan ekspresi EGFR pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari?
3. Apakah terdapat perubahan gambaran histopatologi pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari?

4. Apakah terdapat hubungan ekspresi antara ekspresi LRIG1, ekspresi EGFR dan gambaran histopatologi pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari, sehingga memengaruhi prognosis dari displasia?

1.3. Tujuan:

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui perubahan molekuler dan histopatologi pada tikus wistar model displasia

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui perubahan ekspresi LRIG1 pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari.
2. Mengetahui perubahan ekspresi EGFR pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari.
3. Mengetahui perubahan gambaran histopatologi pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari.
4. Mengetahui hubungan ekspresi antara ekspresi LRIG1, ekspresi EGFR dan gambaran histopatologi pada tikus wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari,

40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari, sehingga memengaruhi prognosis dari displasia.

1.4. Hipotesis:

1. Terdapat perubahan ekspresi LRIG1 pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari.
2. Terdapat perubahan ekspresi EGFR pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari.
3. Terdapat perubahan gambaran histopatologi pada Tikus Wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari.
4. Terdapat hubungan ekspresi antara ekspresi LRIG1, ekspresi EGFR dan gambaran histopatologi pada tikus wistar model displasia yang diberikan isolate betanin dengan dosis 20 mg /200 g BB/hari, 40 mg/200g BB/hari, 80 mg /200 g BB/hari, sehingga memengaruhi prognosis dari displasia.

1.5. Manfaat

1.5.1 Manfaat Bagi Pengembangan Ilmu

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi rujukan model tikus displasia nasofaring dengan diinduksi formaldehida.

2. Hasil penelitian ini diharapkan ekstrak buah naga merah dapat dijadikan sebagai bahan alami yang mampu mencegah displasia / perubahan struktur sel yang terpapar karsinogen.

1.5.2 Manfaat Aplikasi

Penelitian ini diharapkan ekstrak buah naga merah dapat sebagai makanan / minuman sehat dan alami yang mampu mencegah keganasan.

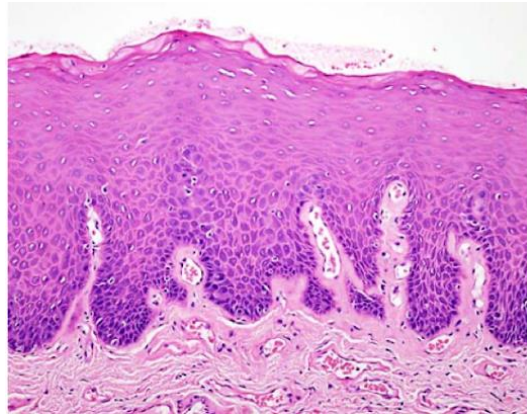
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Displasia

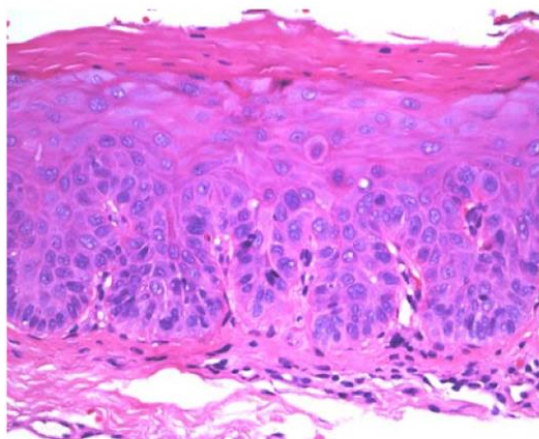
Pada displasia terjadi perubahan secara selular hingga jaringan. Perubahan pada selular yaitu terjadinya variasi dari ukuran nukleus dan bentuknya (*anisonucleosis* dan *pleomorphism*), abnormal variasi dari ukuran dan bentuk dari sel (*anisocytosis* dan *pleomorphism*), peningkatan dari rasio sitoplasma, pembesaran nukleus dan sel, *nucleus hyperchromatic*, peningkatan dari mitosis, abnormal dari mitosis, dan peningkatan dari jumlah dan ukuran dari *nucleoli*. Displasia juga mengakibatkan perubahan jaringan, yaitu hilangnya polaritas, gangguan maturase dari basal, peningkatan densitas selular, *basal cell hyperplasia*, dan *dyskeratosis*. Macam – macam displasia yaitu: *Mild dysplasia (grade I)*, *Moderate dysplasia (grade II)*, *Severe dysplasia (grade III)* (Speight, 2007).

Mild dysplasia (grade I) menunjukkan proliferasi atau *hiperplasia* sel basal dan lapisan pra basal hingga ke epithelium. Terdapat *Cytological atypia* dan *pleomorphism* ringan pada nukleus. Mitosis tidak menonjol, bentuk dari sel berubah secara minimal (Speight, 2007).



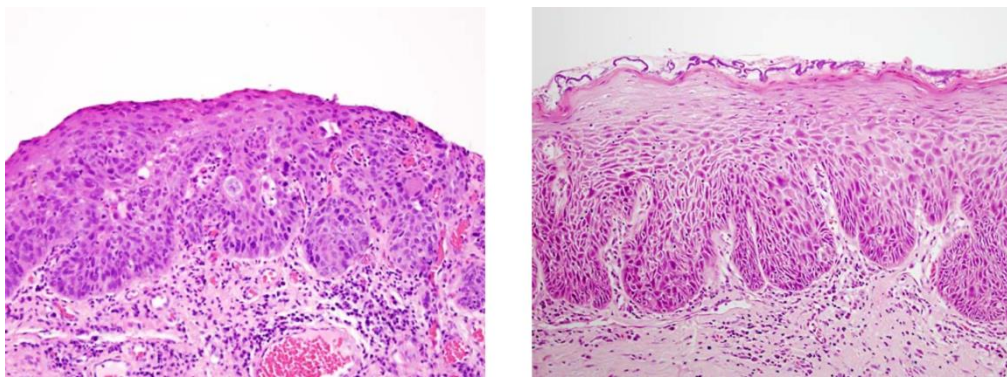
Gambar 2.1. Displasia Ringan (Speight, 2007)

Moderate dysplasia (grade II) terjadi *hyperplasia*, perubahan sitologi yang lebih berat dibandingkan *Mild dysplasia* seperti hiperkromatisasi, *prominent cell* dan polimorfisme dari inti sel yang dapat terlihat. Peningkatan mitosis abnormal. Struktur yang berubah dapat terlihat dalam perubahan bentuk epitel, terjadi perubahan polaritas sel basal dan inti (Speight, 2007)



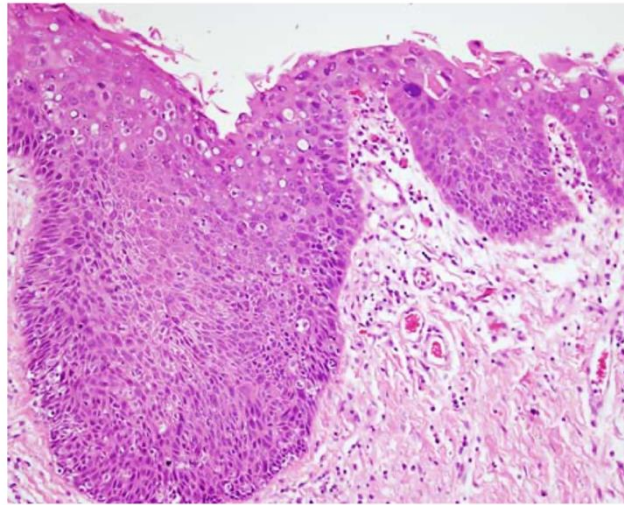
Gambar 2.2. Displasia Sedang (Speight, 2007)

Severe dysplasia (grade III) terdapat proliferasi dari lapisan basal hingga ke epitel. Terjadi perubahan bentuk sel bahkan terdapat inti sel yang memiliki ukuran dan besar yang tidak normal ataupun memiliki banyak nucleoli (Speight, 2007).



Gambar 2.3. Displasia Berat (Speight, 2007)

Carcinoma in Situ merupakan bentuk terberat dari displasia dari epithelial. Karakteristiknya adalah dengan dipenuhi oleh *cytological* dan perubahan dari struktur sel. *Carcinoma In Situ* merupakan *pre malignancy* tanpa invasi. Penanda potensial dari *Carcinoma in situ* adalah analisis dari mutasi p53, *loss of heterozygosity*, terutama pada kromosom 3p dan 9p. Adanya perubahan DNA menjadi *polyploidy* juga merupakan tanda dari keganasan (Speight, 2007).

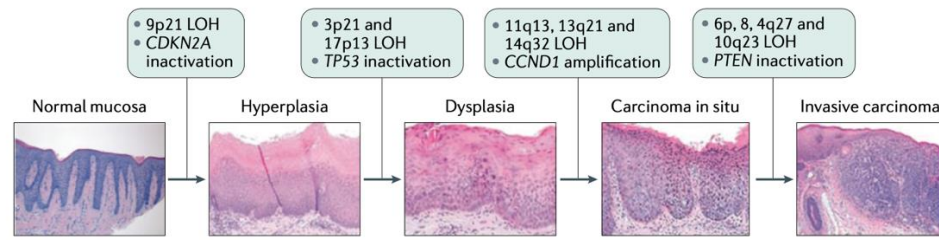


Gambar 2.4. Carcinoma In Situ (Speight, 2007)

Arsitektur dari epitel mengalami disrupsi dan banyak sekali ditemukan sel atipikal dan *nucleus hyperchromatic* pada sel – sel yang terletak di superficial. Beberapa gambaran *Carcinoma in situ* terdapat keratin (Speight, 2007).

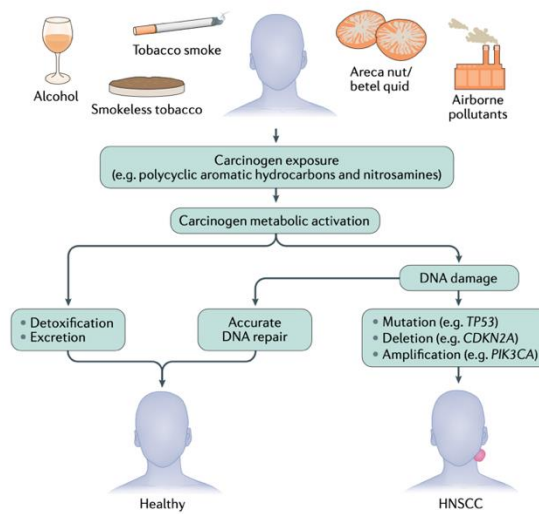
Tabel 2.1. Grading displasia (Nayak, Govind and Jena, 2019)

Grade	Levels involved	Cytological changes	Architectural changes
Hyperplasia	N/A	None	Thickened epithelium, hyperkeratosis, normal maturation
Mild (I)	Lower third	Cell and nuclear pleomorphism, nuclear hyperchromatism	Basal cell hyperplasia
Moderate (II)	Up to middle third	Anisocytosis and anisonucleosis, nuclear hyperchromatism, increased and abnormal mitotic figures	Loss of polarity, disordered maturation from basal to squamous cells, increased cellular density, basal cell hyperplasia, bulbous drop-shaped rete pegs
Severe (III)	Up to the upper third	Cell and nuclear pleomorphism, anisocytosis and anisonucleosis, nuclear hyperchromatism, increased and abnormal mitotic figures, enlarged nuclei and cells, hyperchromatic nuclei, increased number and size of nucleoli, apoptotic bodies	Disordered maturation from basal to squamous cells, increased cellular density, basal cell hyperplasia, bulbous drop-shaped rete pegs
Carcinoma <i>in situ</i>	Full thickness	All changes may be present	Top-to-bottom change, loss of stratification



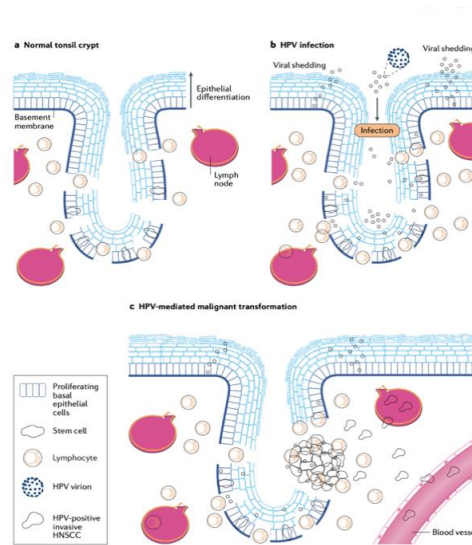
Gambar 2.5. Perubahan Normal Mukosa Hiperplasia menjadi Displasia, Carcinoma in situ hingga Invasive Carcinoma (Johnson et al., 2020)

Pada gambar 2.5 dijelaskan inaktivasi 9p21LOH. Pada normal mukosa dapat menyebabkan hiperplasia. Inaktivasi 3p21 dan 17p13LOH merubah hiperplasia menjadi displasia. Displasia menjadi *carcinoma in situ* disebabkan oleh 11q13, 13q21, 14q32 LOH, dan CCND1 amplifikasi. Perubahan *carcinoma in situ* menjadi Invasive carcinoma dengan inaktivasi dari 6p 8, 4q27 dan 10q23 LOH dan PTEN (Johnson et al., 2020).



Gambar 2.6. Lingkungan memengaruhi kejadian keganasan pada kepala dan leher (HNSCC) (Johnson et al., 2020)

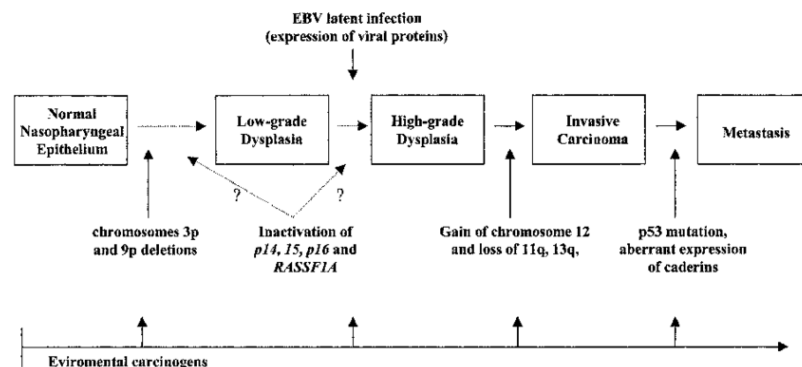
Pada Gambar 2.6 menjelaskan alkohol, rokok dan polusi udara merupakan paparan karsinogen sehingga akan mengaktivasi *carcinogen metabolic*. *Carcinogen metabolic* dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sehingga memengaruhi Mutasi pada TP53, delesi CDKN2A, serta amplifikasi dari PIK3CA sehingga terbentuk HNCC (Johnson et al., 2020).



Gambar 2.7. Infeksi HPV terhadap transformasi epitel normal (Johnson et al., 2020)

Pada Gambar 2.7 dijelaskan bahwa infeksi HPV berpengaruh pada perubahan transformasi epitel yang normal menjadi keganasan. HPV sebagai mediasi transformasi sel normal menjadi malignan. Tipe HPV yang sering menimbulkan kanker adalah HPV tipe 16. Pada spesimen tumor yang berkaitan dengan HPV ini, ditemukan gene yang berperan dalam transformasi epitel normal menjadi keganasan. Gene yang berperan adalah *early gene* (E6 dan E7). *Early gene 6* (E6) membentuk kompleks bersama dengan protein ubiquitylation seluler E6-AP dan p53 untuk memulai terjadinya ubiquitylation dan degradasi proteasomal p53. Hal ini menyebabkan p53 menurun. Berbeda dengan E6, *early gene 7* (E7) berikatan kuat cell cycle regulator, yaitu *retinoblastoma-associated protein* (RB1). Reaksi ikatan ini menyebabkan penghancuran proteasomal RB1. Penghancuran RB1 akibat reaksi E7 menyebabkan adanya upregulasi

umpan balik p16^{INK4A}, dan deteksi adanya p16^{INK4A} (biasanya digunakan untuk deteksi adanya tumor orofaring) (Johnson *et al.*, 2020).



Gambar 2.8. Paparan karsinogen dan Infeksi EBV berpengaruh terhadap perubahan Normal Nasopharyngeal Epithelium menjadi metastasis dengan melalui tahapan low-grade displasia, High-grade displasia dan Invasive Carcinoma (Chan, Teo and Johnson, 2002)

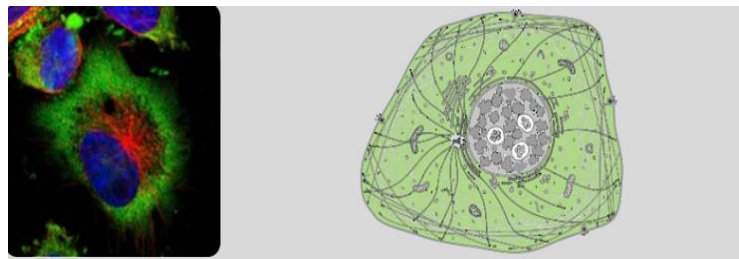
Perubahan epitel nasofaring normal hingga menjadi *invasive* kanker mengalami berbagai proses perjalanan, yaitu *mild dysplasia* melalui proses inflamasi yang didasari oleh peningkatan Cyclin D1, dan penurunan p16, RassF1A. Proses tersebut berlanjut menjadi *severe dysplasia* dengan beberapa komponen yang berpengaruh seperti BART-miRNAs, BARTs, dan BARF1. *Severe dysplasia* menjadi carcinoma in situ dan kemudian menjadi *Invasive cancer* (Pieter and Prawira, 2021).

2.1. Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain (LRIG1)

LRIG1 merupakan tumor *suppressor* gen yang berasal dari LRIG family. Ekspresi dari LRIG1 secara signifikan berpengaruh terhadap prognosis suatu keganasan (An *et al.*, 2015). Terdapat 3 jenis LRIG, yaitu: LRIG1, LRIG2 dan LRIG3. LRIG1 adalah *negative regulator* pertumbuhan dari tumor (sebagai tumor *suppressor in vitro* dan *in vitro* pada mice. LRIG2 dan LRIG3 belum terlalu banyak ditemukan fungsinya jika dibandingkan dengan LRIG1. LRIG adalah gen dan ekspresi dari protein yang ada karena disregulasi dari sel. Pada kanker payudara LRIG1 dapat dijadikan sebagai marker prognosis baik dan buruknya suatu prognosis, dan dapat juga untuk mengetahui apakah termasuk awal atau akhir dari suatu *grade cancer/tumor*. Level dari LRIG1 relevan dengan prognosis indikator pada semua tipe cancer pada manusia. LRIG pada manusia memiliki tiga gen, yaitu: LRIG1 pada kromosom 3p14, LRIG2 pada kromosom 1p13.1 dan LRIG3 pada kromosom 12q14.1. Pada beberapa penelitian menyebutkan bahwa LRIG1 menekan proliferasi dari sel normal dan transformasi dari sel. Sel normal yang melakukan proliferasi akan menekan ekspresi dari LRIG1 (D Lindquist *et al.*, 2014). Ekspresi dari LRIG1 berasosiasi dengan tipe patologi, perbedaan status dan staging dari kanker (An *et al.*, 2015).

LRIG1 banyak ditemukan di sitosol, memiliki spesifisitas pada T-reg dan lokasi predileksi adalah pada membrane, serta merupakan marker dari prognosis kanker paru dan kanker pada saluran kemih. (David Lindquist *et al.*, 2014). Ekspresi dari LRIG1 juga bisa terekspresi di jaringan normal dan terdeteksi pada 26 jaringan . LRIG1 juga memiliki 5 anggota dari LRIG Family

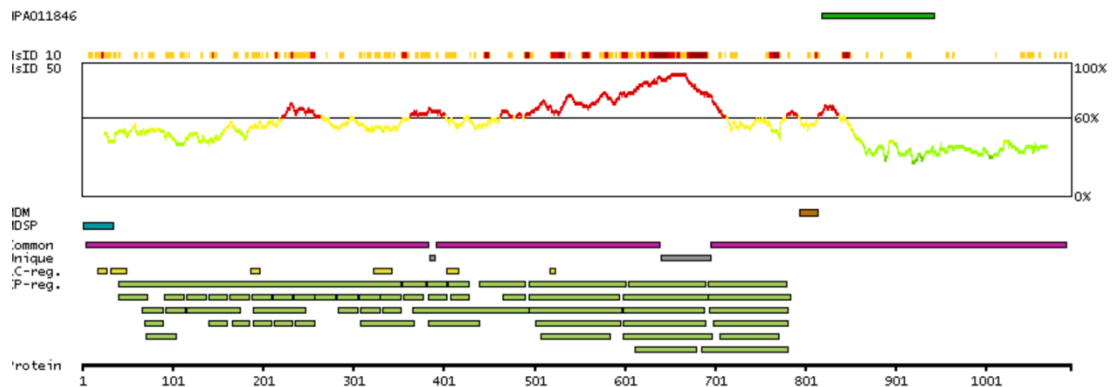
human, yaitu LRIG1, LRIG2, LRIG3, Drosophila Lambik dan Caenorhabditis elegans Sma-10. Informasi antigen dari LRIG1 dapat dilihat pada Tabel 2.2 dan Gambar 2.10.



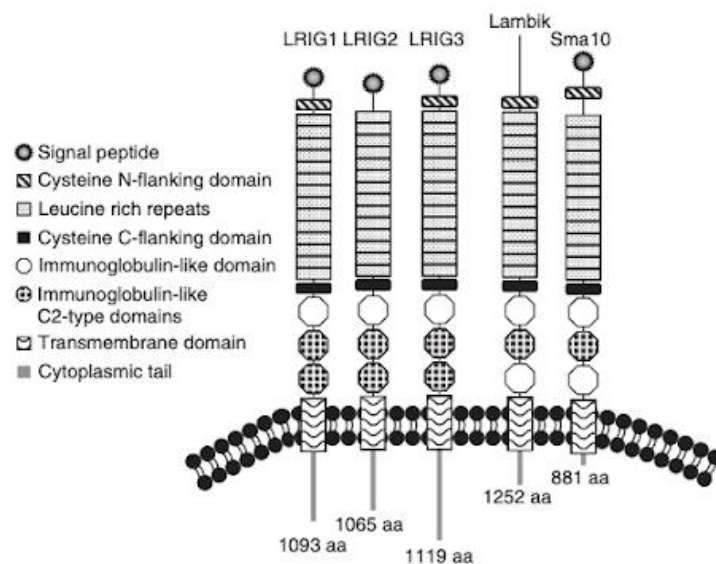
Gambar 2.9. LRIG1 Banyak ditemukan di Sitosol (The Human Protein Atlas, 2022)

Tabel 2.2. Informasi Antigen LRIG1 (The Human Protein Atlas, 2022)

Informasi Antigen	
Antigen	Recombinant protein fragment
Length (aa)	125
Antigen sequence	TRKKSEEYSVTNTDETWOODVOSTLSSQGTLSDRQETVV RTEGGPQANG HIESNGVCPRDASHFPEPDTHSVACRQPKLCAGSAYHKEP WKAMEKAEGT PGPHKMEHGGRVVCSDCNTEVDCYS
Matching transcripts	LRIG1-201 – ENSP00000273261 [100%] LRIG1-201 – ENSP00000373208 [100%]
Matching mouse transcripts	ENSMUSP00000032105 [74%] ENSMUSP00000098686 [74%] ENSMUSP00000144963 [74%] ENSMUSP00000052126 [74%] ENSMUSP00000035999 [74%]



Gambar 2.10. Antigen Informasi dari LRIG1 (The Human Protein Atlas, 2022)



Gambar 2.11. Struktur dari LRIG. Terdapat 5 anggota dari LRIG Family human LRIG1, LRIG2, LRIG3, Drosophila Lambik dan Caenorhabditis elegans Sma-10 (Simion, Cedano-Prieto and Sweeney, 2014)

LRIG1 gene diekspresikan di berbagai jaringan, delesi pada 3p14 sering dapat mengakibatkan kanker. LRIG 1 adalah *single transmembrane*

yang berpengaruh terhadap sinyal pertumbuhan suatu sel, proliferasi sel, dan mekanisme supresi dari tumor. LRIG1 berinteraksi terhadap reseptor tirosin kinase dan menghambat EGFR, RET dan MET reseptor sinyal pada berbagai *pathways* yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan proliferasi dari sel. Penurunan ekspresi dari LRIG1 menandakan prognosis yang buruk pada kanker kulit, *cervical cancer*, kanker payudara dan kanker pada kandung kemih. Pada beberapa penelitian menyebutkan tumor dengan peningkatan ekspresi LRIG1 akan berasosiasi dengan respon terapi pada *platinum based chemotherapy agents* (Simion, Cedano-Prieto and Sweeney, 2014).

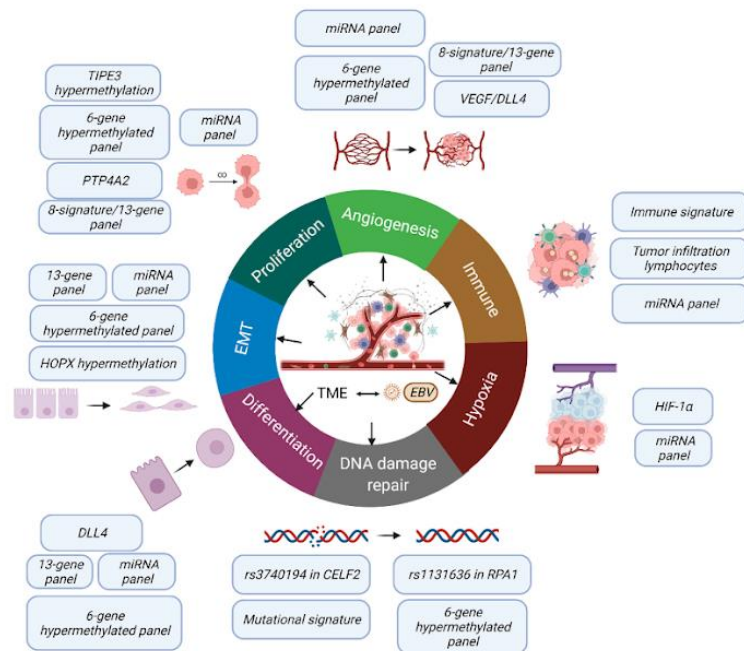
Pada tahap molekuler LRIG1 sebagai dampak negatif dari regulasi sinyal faktor pertumbuhan melalui reseptor *tyrosine kinase*. Terdapat beberapa mekanisme dari LRIG1 sebagai suppressor dari proliferasi tumor, yaitu: LRIG1 menginduksi *ubiquitytation* dan degradasi reseptor dari EGFR dan anggota EGFR, menstabilkan MET reseptor dan berinteraksi dengan RET reseptor untuk menghambat RET phosphorylation dan melakukan *down stream* terhadap sinyal pertumbuhan sel (D Lindquist *et al.*, 2014). LRIG1 bekerja sebagai suppressor tumor dan negative regulator dari EGFR. EGFR mampu menstimulasi proliferasi, migrasi dan metastasis dari berbagai macam tipe tumor. LRIG1 terletak di 3p14.3. Pada penelitian menyebutkan pada tumor grade 4 ekspresi dari LRIG1 akan lebih rendah dibandingkan dengan tumor dengan grade lebih rendah (Hedman *et al.*, 2002).

Terjadi perubahan disregulasi dari ekspresi LRIG1 pada sel yang melakukan proliferasi. Transkripsi dari LRIG 1 dapat diinduksi oleh ekspresi dari faktor pertumbuhan atau hormon steroid. Sebagai contoh: ekspresi berlebih dari ERBB2 dapat menekan reseptor estrogen, penekanan terhadap reseptor dari estrogen mampu menginduksi LRIG1. Selain proliferasi atau over ekspresi dari suatu gen atau protein yang mampu menyebabkan tumor, pada beberapa penelitian menyebutkan merokok mampu menurunkan kadar dari LRIG1 (D Lindquist *et al.*, 2014).

Epidermal growth factor receptor (EGFR) adalah protein transmembrane tyrosine-kinase dan mengalami ekspresi berlebih pada berbagai lesi malignan. Ekspresi berlebih dari EGFR merupakan step awal dari proliferasi dari sel, invasi dari sel, migrasi dan apoptosis. LRIG1 mampu berinteraksi dengan EGFR. Pada beberapa penelitian menyebutkan bahwa LRIG1 adalah suppressor dari EGFR. Pada penelitian tentang cancer bladder menyebutkan ekspresi dari LRIG1 mampu menekan ekspresi dari EGFR dengan menekan ekspresi protein dengan menginduksi apoptosis dari sel dan melakukan inhibisi dari pertumbuhan sel. Pada pemeriksaan Imunohistokimia terkait dengan LRIG1 dan EGFR pada penelitian dengan cancer blader menyebutkan ekspresi LRIG1 pada T2-T3 signifikan rendah dibandingkan dengan pada T1 cancer blader dan berkebalikan dengan ekspresi EGFR yang meningkat pada T2-T3 jika dibandingkan dengan T1. Pada penelitian dengan cancer bladder dan diberikan transfeksi LRIG1 cDNA dan kemudian di deteksi keberadaan EGFR, ditemukan bahwa tidak

berdampak pada EGFR di level mRNA namun berdampak pada EGFR pada tingkat protein. Hal tersebut dikarenakan LRIG1 mampu merubah ligand melalui *ubiquition* pada ErbB receptor pada c-Cbl dependent yang juga dapat mengakibatkan degradasi dari EGFR. Pada penelitian yang sama juga menyebutkan upregulasi dari LRIG1 dapat menginduksi apoptosis dan menekan pertumbuhan dari sel. Sinyal EGFR yang berpengaruh pada LRIG1 adalah MAPK dan AKT (Chang *et al.*, 2013).

Pada kanker nasofaring berdasarkan *systematic review* ditemukan terdapat 8 biomarker penting yaitu: *single nucleotide polymorphisms* (SNP), metilasi, microRNAs, mutasi, gen kanker, variasi sinyal dan *pathways* sehingga terjadinya kanker dan imun. Penelitian pada kanker nasofaring disebutkan terdapat beberapa gen yang digunakan untuk mengetahui prognosis. Berdasarkan kohort 937 studi tentang kanker nasofaring diketahui terdapat gen gen yang berpengaruh yaitu: YBX3, CBR3, CXCL10, CLASP1, DCTN1, FNDC3B, WWSB2, LRIG1, GRM4, ANXA1, WNK1, HDLBP dan POLR2M. Genetik dari pasien dengan kanker nasofaring akan memengaruhi prognosis dari kanker nasofaring melalui germline (SNPs dan mutasi) epigenetic terdiri dari DNA METILASI DAN miRNA, gen penyebab atau yang berkaitan dengan kanker itu sendiri dan imun dari sel. Keseluruhan molekul ini dapat berdampak pada angiogenesis, *hypoxia*, EMT, diferensiasi dan respon dari imun (Islam *et al.*, 2022).

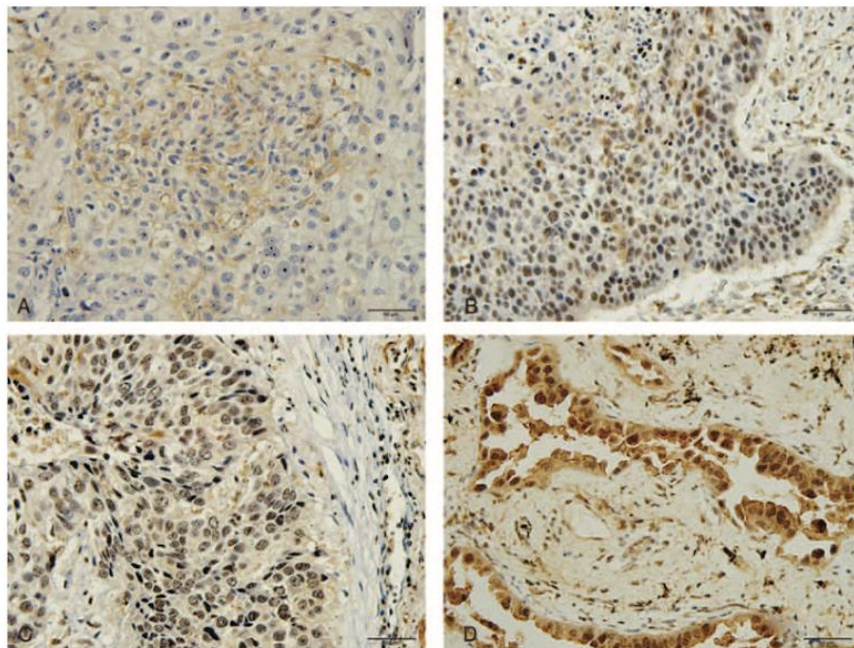


Gambar 2.12. Perubahan dari Fungsi Biologi terkait oleh Biomarker yang teridentifikasi pada Genetic Pasien dengan Kanker Nasofaring (Islam et al., 2022)

Yaitu *germline single nucleotide polymorphisms* (SNPs) dan mutasi, *epigenetic* (DNA metilasi dan microRNA) dan ekspresi gen dari sel cancer dan sel imun yang berada pada lingkungan mikro. Perubahan molekuler dari cancer mengubah proliferasi, *DNA damage repair*, *angiogenesis*, *hypoxia*, *epithelial to mesenchymal transition* (EMT), diferensiasi dari sel dan respon imun (Islam et al., 2022).

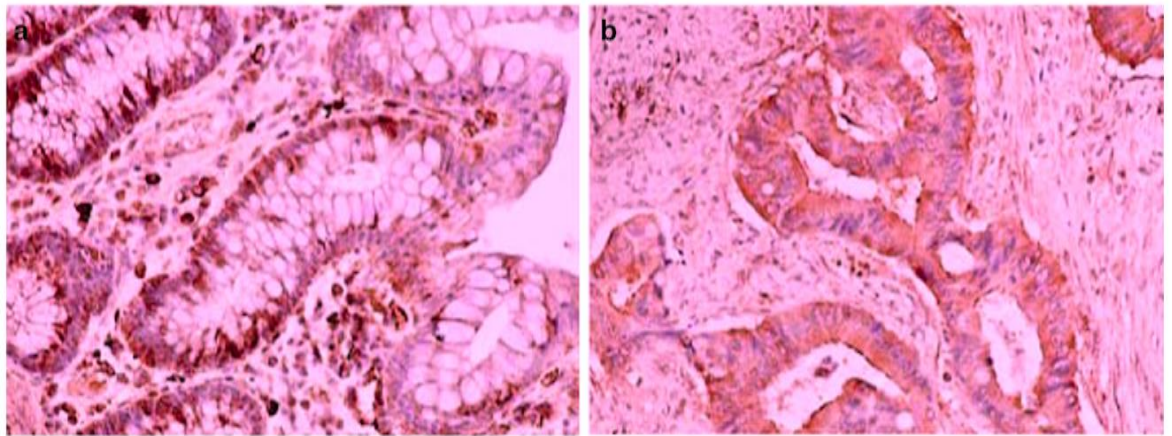
Pada penelitian dengan NSCLC (*Non small cell lung cancer*) LRIG1 konsentrasinya memengaruhi tipe patologi, perbedaan status dan stage dari tumor. Pada penelitian dengan NSLC konsentrasi LRIG1 dipengaruhi oleh jenis kelamin, usia (<60 tahun dan ≥ 60 tahun), tipe patologi dan

perbedaan status (well, moderate, poor) stage (IA-IB, IIA-IIB, IIIA), Riwayat perokok dan bukan perokok. Pada penelitian tersebut disampaikan bahwa. Jenis kelamin laki – laki memiliki konsentrasi yang lebih besar dan usia kurang 60 tahun memiliki konsentrasi LRIG1 yang lebih banyak, perbedaan status cancer, well memiliki konsentrasi terbanyak, dan stage IA-IB memiliki lebih banyak konsentrasi dibandingkan dengan status II dan III. Pasien tidak merokok memiliki konsentrasi LRIG1 lebih tinggi dibandingkan dengan yang merokok (Succony Laura, 2017).



Gambar 2.13. Imunohistokimia dari LRIG1 pada jaringan NSCLC pada gambar A menggambarkan tidak adanya LRIG1 pada nucleus, B. mild, C.moderate, D. High ekspresi (An et al., 2015)

Penelitian dengan *Colorectal cancer* konsentrasi dari LRIG1 untuk menentukan prognosis dari *Colorectal cancer* dengan menggunakan IHC dan RT-PCR. Pada penelitian ini diketahui bahwa pada jaringan tumor ditemukan 37,4% dan jika dibandingkan dengan control yaitu jaringan normal konsentrasi dari LRIG1 lebih tinggi pada jaringan yang normal. Pada colorectal cancer diketahui terjadi peningkatan EGFR dan HER2 berbanding signifikan dengan penurunan konsentrasi dari LRIG1 (Bakherad *et al.*, 2021).



Gambar 2.14. IHC konsentrasi LRIG1 pada colorectal cancer dengan berbagai perbesaran Gambar A. adalah dengan perbesaran x10 dan Gambar B adalah dengan perbesaran x 100 (Bakherad *et al.*, 2021)

2.2 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

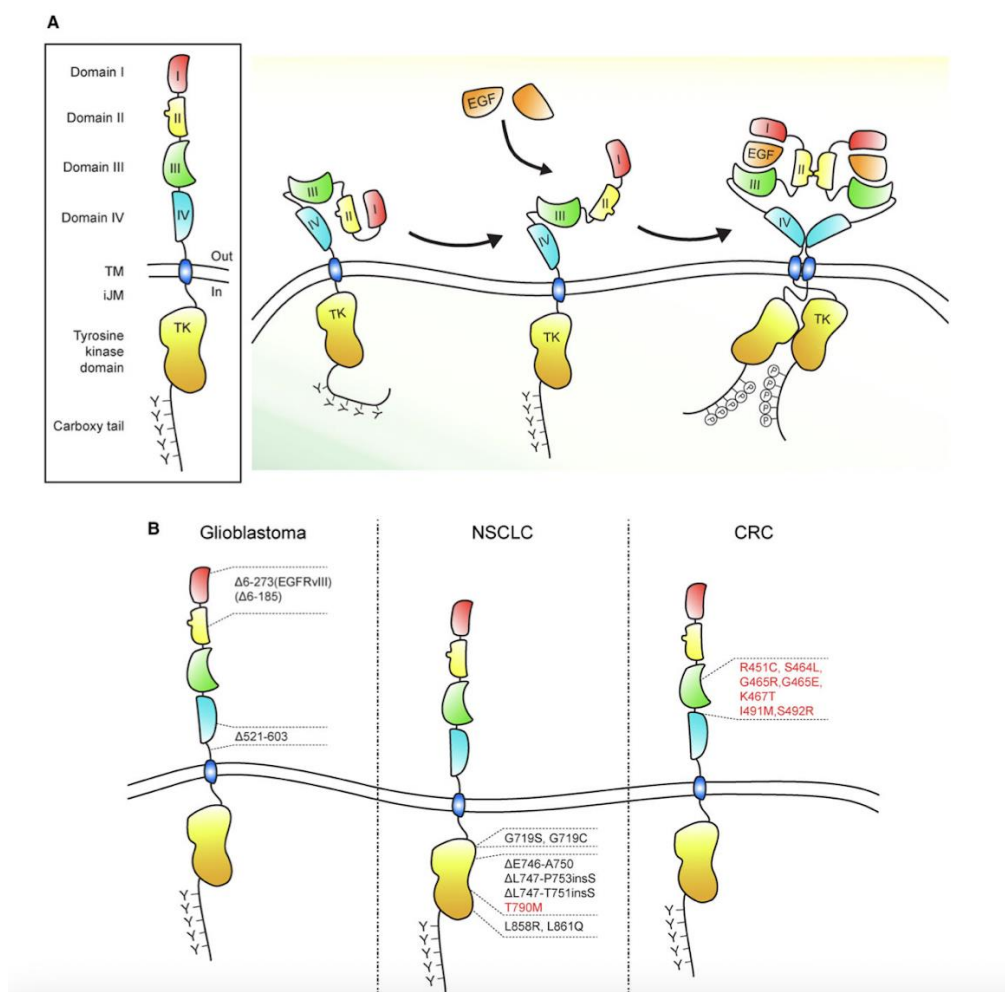
EGFR adalah *prototypical* reseptor tyrosine kinase yang terkespresi berlebihan pada berbagai kanker termasuk keganasan kepala dan leher.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) merupakan anggota dari ErbB/HER family dari reseptor tyrosine kinase, Tyrosine kinase merupakan suatu inti dari suatu proses survive dari suatu sel. EGFR adalah gen pada proses carcinogenesis yang mengalami *overexpression* dan mutasi di banyak kanker. EGFR merupakan protein transmembrane pada *extracellular ligand-binding domain*, transmembrane domain, *juxtamembrane segmen*, *tirosin kinase domain* dan *C terminal regulatory tail* (Nair, Bonner and Bredel, 2022).

EGFR merupakan sinyal pertumbuhan dari cancer. EGFR terletak pada lengan pendek kromosom 7 (7p12.1). Mutasi EGFR dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu mutasi yang menyebabkan perubahan ekstraselular, mutasi yang menyebabkan perubahan intraselular dan mutasi yang menyebabkan perubahan tyrosin-kinase. Pada perubahan tyrosin kinase mutasi terjadi pada regio 18, 19, 20, 21. Overekspresi EGFR pada kanker nasofaring dilaporkan 80% terlihat pada immunohistochemically. Ekspresi berlebihan pada EGFR diketahui menyebabkan angka survival yang pendek, prognosis yang buruk dan umumnya tinggi pada jenis non keratinisasi pada pasien dengan kanker nasofaring (Uzun and Erkilic, 2022).

Secara fisiologis fungsi dari epidermal growth factor receptor adalah untuk meregulasi pertumbuhan jaringan epitel dan homeostasis. Secara patologi kebanyakan keganasan pada paru, payudara dan *glioblastoma*, EGFR berperan pada tumorigenesis. Pada aktivasi yang tidak beraturan

EGFR berperan dalam kanker dan mengalami mutasi pada lokus gen, transkripsi, ligan yang berekspresi lebih. EGFR sering digunakan untuk biomarker dari sebuah resistensi dari Tumor (Sigismund, Avanzato and Lanzetti, 2018).



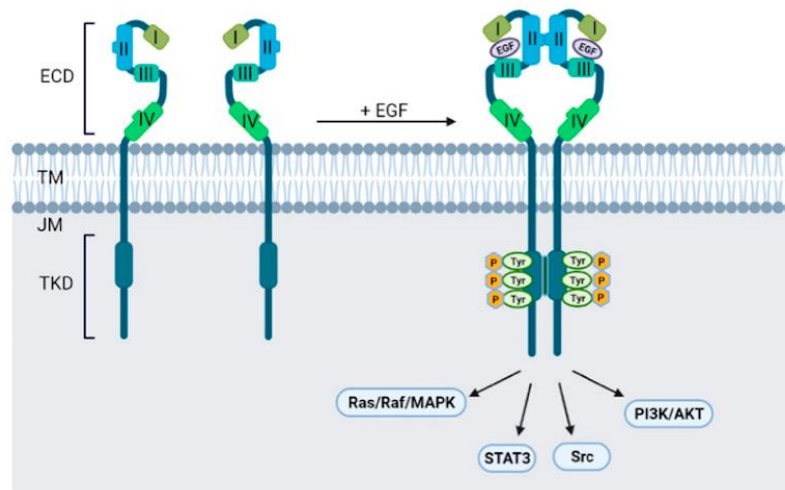
Gambar 2.15. Skema mutasi pada EGFR pada glioblastoma, kanker paru – paru dan kanker kolorektal (Sigismund, Avanzato and Lanzetti, 2018)

Pada gambar A menggambarkan skema dari EGFR dan EGFR menginduksi serta mengaktivasi dari suatu reseptor. Pada gambar B menjelaskan mutasi EGFR terjadi pada tumor yang mengalami resisten dan memiliki prognosis yang buruk. Blockade tergambar pada gambar berwarna merah (Sigismund, Avanzato and Lanzetti, 2018).

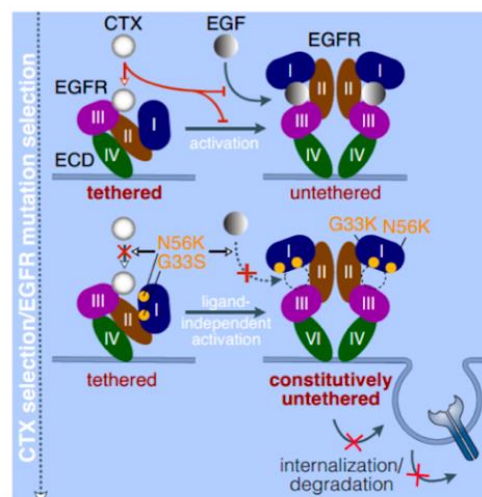
Pada penelitian EGFR pasien dengan *nasopharyngeal carcinoma* ditemukan bahwa terjadi peningkatan EGFR. EGFR merupakan reseptor *tyrosine kinase family* yang berfungsi dalam mengatur regulasi dari proliferasi dan kemampuan bertahan dari sel tumor. Setelah berikatan maka akan terjadi aktivasi dan pembentukan *homodimer* dan *heterodimer* (*phosphorylation*) yang kemudian akan terbentuk *cellular differentiation*, *proliferation* dan *carcinogenesis*. Pada beberapa penelitian mengatakan EGFR meningkat pada NPC, dan terjadi kontroversi antara jumlah dari EGFR dibandingkan dengan prognosis (semakin tinggi tingkat EGFR, maka akan semakin buruk prognosis dari NPC). Ekspresi dari EGFR yang tinggi akan memengaruhi dari *cellular differentiation* dan berkontribusi pada agresivitas sel tumor, seperti peningkatan metastasis dan migrasi, kemoterapi dan radioterapi resisten (Chen *et al.*, 2021).

80% - 90% *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)* mengekspresikan EGFR secara berlebih dan akan berhubungan dengan perburukan dari prognosis. Target Molekuler EGFR dengan *monoclonal* antibodi dengan menghambat sinyal dari EGFR. *Overexpression* dari

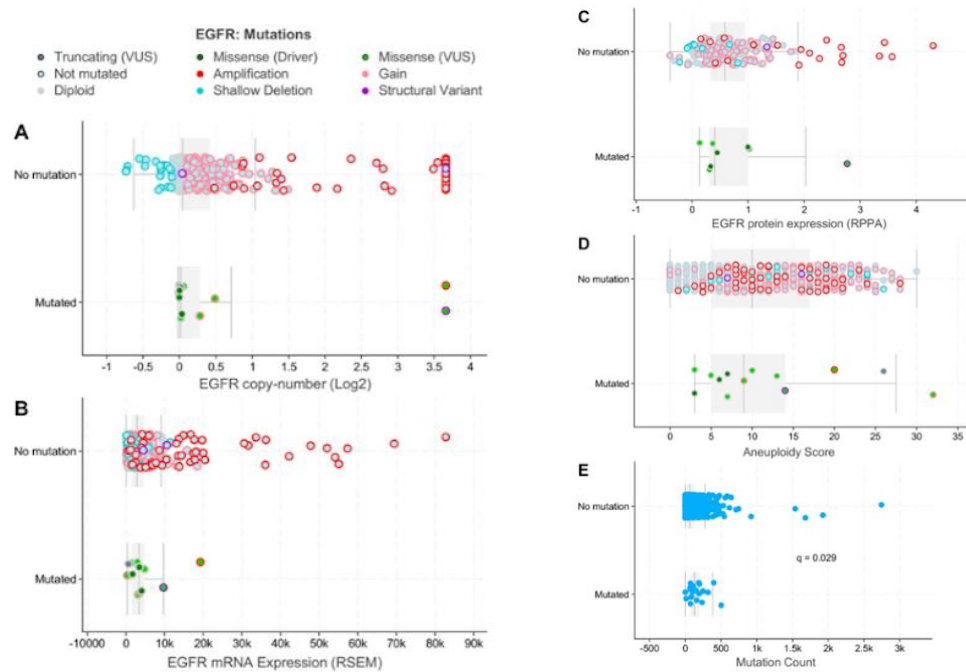
receptor tyrosine kinase termasuk *HER2* dan *MET* dapat menjadikan resisten target EGFR (Johnson *et al.*, 2020).



Gambar 2.16. Struktur dari EGFR (Nair, Bonner and Bredel, 2022)



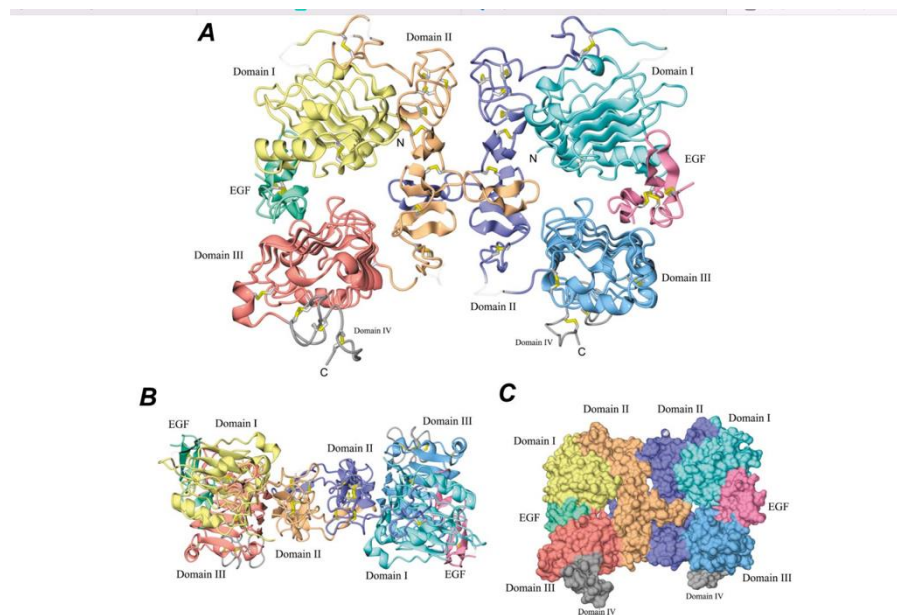
Gambar 2.17. CTX dan EGF berikatan pada sel normal. Mutasi pada ECD pada EGFR di sel kanker (Nair, Bonner and Bredel, 2022)



Gambar 2.18. Mutasi dari EGFR A. copy EGFR, B. pada mRNA C.pada protein, D. genome aneuploidy, E. mutasi terjadi lebih banyak (Nair, Bonner and Bredel, 2022)

EGF-EGFR dikaitkan dengan sinyal tyrosine kinase (Singh *et al.*, 2016). *Epidermal growth factor* receptor (EGFR) berkembang pada berbagai organisme multiseluler. EGFR mengalami dimerisasi dengan homolognya yaitu ErbB-2, ErbB-3 dan ErbB-4 dan meningkatkan aktivitas tirosin kinase pada intraselulernya sehingga mampu mengaktifkan sinyal kaskade yang memiliki berbagai dampak seperti proliferasi sel, penurunan apoptosis dan angiogenesis. Faktor pertumbuhan EGFR adalah sitokin asam amino yang dibelah secara proteolitik dari precursor protein membrane integral besar. EGFR terdiri dari 12 ligans atau faktor pertumbuhan yang memiliki beberapa klasifikasi yang termasuk di dalam 5 grup, yaitu : 1. Faktor pertumbuhan yang berinteraksi dengan EGFR (ERBB1): *Transforming growth factor alpha* (TGFA), *amphiregulin* (AREG), *vaccinia growth factor* (VGF), *shope fibroma growth factor* (SFGF), dan *myxoma virus growth factor* (MGF), 2. Ikatan heregulin, berikatan dengan ERBB3 dan ERBB4: neuregulins 1 dan 2 (NRG1, NRG2), 3. Ikatan yang berikatan seimbang dengan EGFR dan ERBB4: *betacellulin* (BTC) dan *heparin-binding EGF-like growth factor* (HBEGF), 4. Ikatan eksklusif dengan ERBB4 :

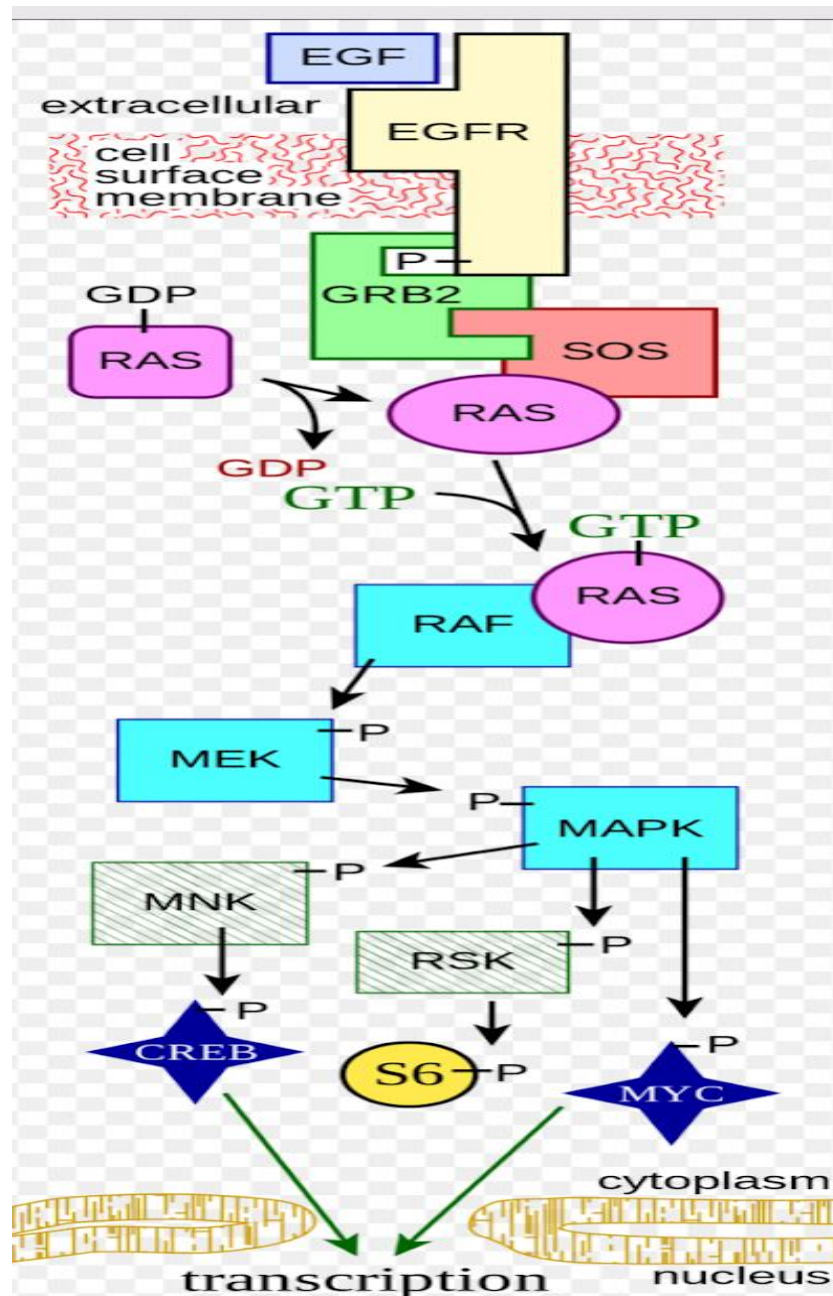
neuregulins 3 dan 4 (NRG3, NRG4) dan 5. Ikatan yang spesifik dengan EGFR, ERBB3 atau ERBB4: epiregulin (EREG).



Gambar 2.19. Struktur kristal dari kompleks EGF – EGFR (Ogiso et al., 2002)

EGFR adalah precursor trans membrane memproses dan disekresi oleh proteolysis di dalam aktif soluble yang berfungsi sebagai sinyal. Gangguan yang terjadi dari ekspresi faktor pertumbuhan menyebabkan *autocrine*

pathway yang mengalami pertumbuhan sel yang tidak terkendali dan menyebabkan transformasi neoplasma.



Gambar 2.20. MAPK/ERK pathway. EGF berikatan dengan Epidermal Growth Factor Receptor pada permukaan, ikatan tersebut menginduksi dimerisasi

Setiap ikatan atau ligan bersifat bivalen dikarenakan sifatnya yang memiliki afinitas tinggi dan afinitas rendah. Bentuk monomer reseptor tirosin kinase tidak aktif, berbeda dengan setelah melalui oligomerisasi atau setelah mengalami homodimerisasi maka akan mengalami aktivasi aktivitas tirosin kinase intrinsik dan transfosforilasi residu tirosin spesifik. Transfosforilasi menyebabkan *docking* pada reseptor yang aktif sehingga beragam peristiwa terkait pensinyalan dimulai. Reseptor Tirosin Kinase mengandung motif *Src-homology 2* (SH2) atau motif peningkatan fosfotirosin (PTB) yang akan mengatur regulasi ekspresi dari gen sehingga EGF memiliki potensi mitogenik diferensial. Penggabungan reseptor tertentu mampu meningkatkan persinyalan pada tingkat efektor. Pada penelitian yang dilakukan oleh Lian *et al* 2019 melakukan penelitian tentang Sekresi EGFR untuk melakukan Polarisasi pada M2 melalui EGFR/PI3K/AKT/mTOR *pathway*. Pada Penelitian tersebut dikatakan Tumor-associated macrophage (TAMs) adalah salah satu sel imun penting. Makrofag berasal dari diferensiasi dari monocytes pada jaringan yang terdiri dari 2 bentuk yaitu M1 dan M2. M1 diaktivasi oleh sitokine seperti interferon yang melakukan proinflamatori dan sitokin imunostimulator. M2 diaktifkan

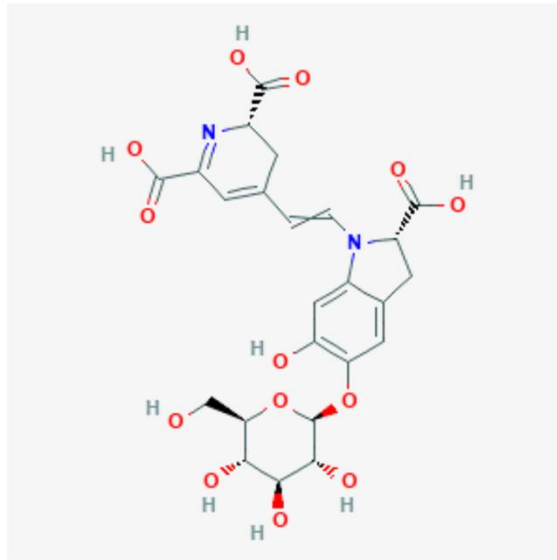
oleh sitokin Th2 seperti IL-4 dan IL-10. TAM berfungsi dalam pertumbuhan sel, invasi, metastasis dan keterlibatan imun. PI3K teridentifikasi sebagai gen onkogenik yang mengubah sel normal menjadi sel yang mengalami keganasan. PI3K signaling terlibat dalam proses selular, seperti proliferasi, survival, metabolisme dan imunitas. Smad-PI3K-Akt-mTOR *pathway* terkait ekspresi M2 makrofag. Pemeriksaan level dari TGF-beta, EGFR dan HGF dilakukan dengan ELISA. Semakin tinggi level dari EGFR maka M2 makrofag semakin tinggi levelnya dan tingkat keparahan suatu keganasan juga semakin meningkat (Lian et al., 2019).

2.3 Betanin

Betanin merupakan senyawa yang memiliki pigmen dasar berwarna merah hingga merah tua, memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan memiliki aktivitas sebagai penghambat toksisitas. Sebagai alternatif suplemen dalam mengatasi *stress* oksidasi, inflamasi, menurunkan kadar gula darah dan penyakit kronik lain. Betanin disebut juga phytolaccamin, yaitu pigmen merah yang larut dengan air, betanin memiliki rumus molekul $C_{24}H_{26}O_{13}$ dan berat molekul 550,5 g/mol (National Center for Biotechnology Information, 2020). Betanin (betanidin-5-O-beta-glucoside) tersusun dari aglikon betanidin yang terhubung pada bet-glikosidik dengan unit glukosa pada atom C5.

Betanin memiliki aktivitas mampu mengatur gen melalui nuclear factor (erythroid-derived 2) – like 2- (Nrf2), selain itu betanin juga mampu mencegah oksidasi pada low density lipoprotein (LDL) dan kerusakan DNA (da Silva *et al*, 2019).

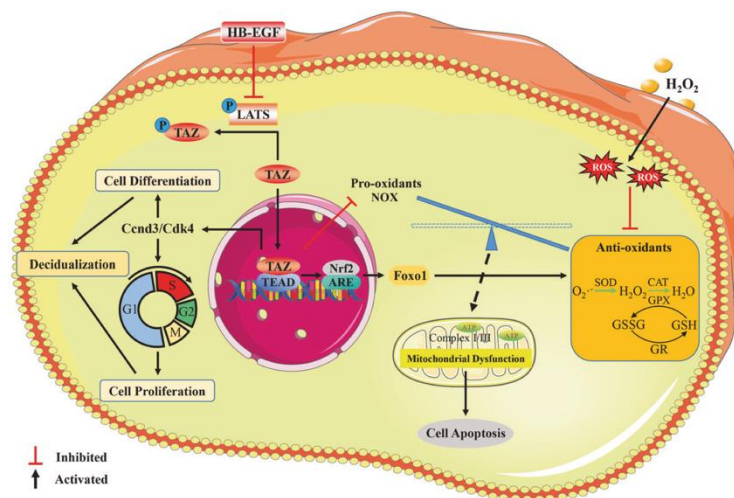
Betanin dapat berbentuk padatan seperti pasta dan bubuk. Betanin larut di dalam air, yaitu sebesar 5391 mg/L pada suhu 250C (CAB Internasional, 2020). Senyawa Betanin merupakan senyawa alkaloid yang terdapat pada tanaman *R. humilis* dan *Phytolacca americana* yang berasal dari famili yang sama. Betanin juga merupakan pigmen berwarna ungu yang ditemukan pada tanaman famili Centrospermae. Tanaman lain yang mengandung betanin adalah tanaman bit (*Beta vulgaris* L.). Betanin dari tanaman bit diisolasi dengan metode kromatografi.



Gambar 2.21. Struktur betanin

Teknik yang ditelusuri adalah purifikasi betanin dari buah yang banyak mengandung betalain terbanyak yaitu *Opuntia ficus-indica*. Purifikasi dilakukan dengan menggunakan metode Aqueous two-phase system. Efek antioksidan dari betanin berasal dari gugus amin siklik dan hidroksil yang berperan sebagai donor elektron dan hidrogen, sehingga dapat menstabilkan senyawa reaktif (da Silva *et al*, 2019). Aktivitas antioksidan dari betanin melalui mekanisme seperti inhibisi peroksidasi linoleate, inhibisi oksidasi low density lipoproteins (LDL), inhibisi ekspresi intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) dan inhibisi nitrosative stress serta kerusakan DNA. Antioksidan betanin memiliki aktivitas hepatoprotektor melalui inhibisi aktivitas sitokrom CYP2E1 dan CYP3A2 yang menyebabkan kerusakan hati, serta antiinflamasi (Gumansalangi *et al*, 2019).

Penurunan konsentrasi LDL setelah konsumsi betanin terbukti pada penelitian Rahimi *et al* tahun 2019, yaitu subjek dengan penyakit arteri koroner diberikan suplemen ekstrak bit yang mengandung betanin 50 mg selama 5 minggu menunjukkan penurunan HDL-C dan LDL pada darah serta peningkatan profil lemak. Selain itu juga mampu mengatasi *stress* oksidasi, inflamasi dan penyakit yang berhubungan dengan penuaan. Hal tersebut terlihat dari ekspresi dari gen SIRT1 dan penurunan gen LOXI (Rahimi *et al*, 2019). Uji antioksidan dari Betanin dengan metode DPPH diketahui adalah 145,27 menandakan aktivitas antioksidannya tergolong kuat (Rahimi *et al*, 2019).



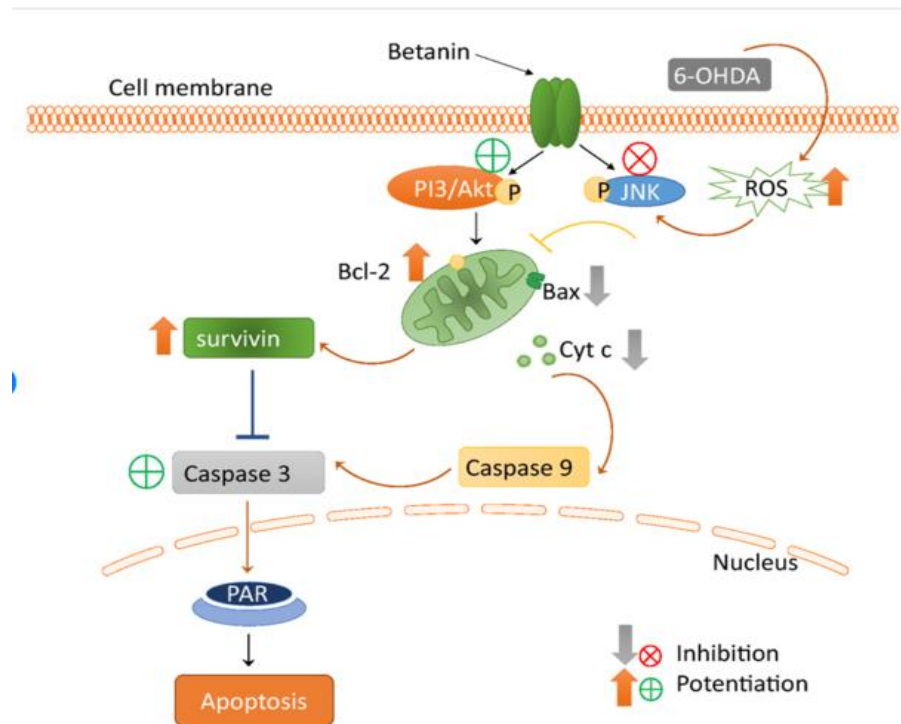
Gambar 2.22. Betanin sebagai antioksidan memengaruhi Nrf2/Are/Foxo1 pathway (Yu et al., 2021)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Ahmadi et al pada tahun 2020, Betanin secara signifikan menghambat fungsi dari microglial yang diinduksi lipopolisakarida termasuk produksi radikal bebas oksida nitrat,

spesies oksigen reaktif, tumor nekrosis faktor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6) dan interleukin-1 beta (IL-1Beta). Selain itu, betanin memodulasi potensi mitokondria, permeabilitas membran lisosom, dan adenosin trifosfat. Setelah dilakukan analisis docking betanin diketahui memiliki energi ikat negatif yang signifikan terhadap situs TNF-alpha, IL-6 dan iNOS. Betanin diketahui memiliki potensi menekan sel kanker, peroksidasi lipid dan disintegrasi heme secara in vitro. Betanin secara signifikan menekan aktivitas NF-KB pada tikus, setelah dirangsang dengan kerusakan ginjal akut. Pada penelitian Reddy *et al.*, betanin menekan sebanyak 97% aktivitas enzim dalam siklooksigenase-2 (COX-2) yang sebanding atau bahkan lebih besar dari beberapa senyawa fenolik dan beberapa obat antiinflamasi seperti Celebrex, Vioxx dan Ibuprofen. Betanin mampu menstimulasi sel microglial untuk suatu efek yang memungkinkan reduksi dari inflamasi pada saraf (Ahmadi *et al*, 2020).

Pretreatment betanin mengarah pada peningkatan kadar ATP dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi LPS, perubahan dalam disfungsi mitokondria dan penghambatan *stress* oksidatif yang mampu memengaruhi stabilitas membran lisosom. Sel – sel yang diberikan perlakuan sebelumnya dengan betanin akan mengalami peradangan yang lebih sedikit daripada kelompok yang diberikan LPS. Efek positif betanin adalah dapat mengurangi ekspresi TNF-alpha secara signifikan. TNF-alpha menyebabkan molekul pro adhesive di sel endotel yang

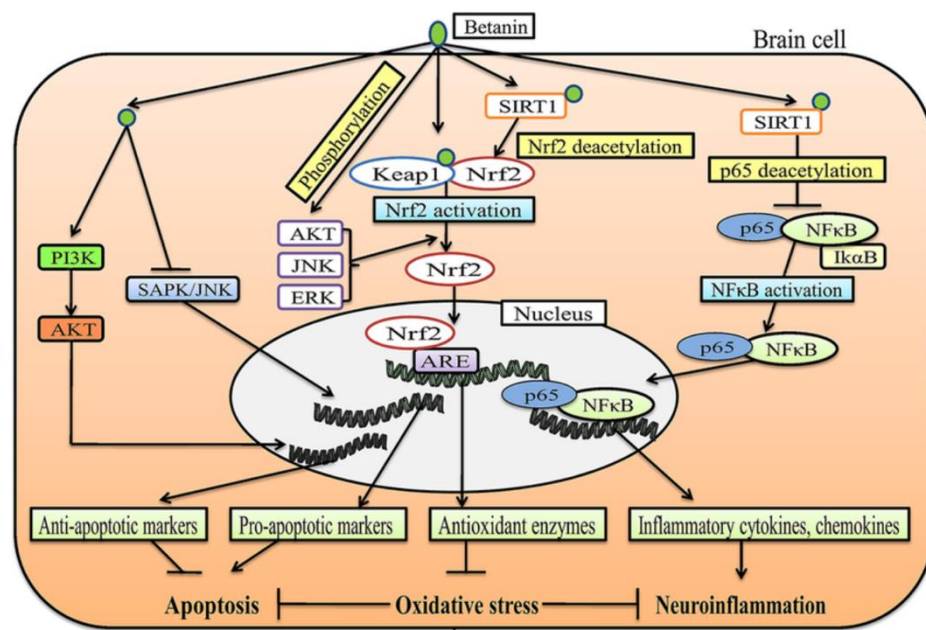
menyebabkan peradangan semakin luas. Peningkatan TNF- alpha meningkatkan produksi ROS, aktivasi jalur p38, JNK, dan NF-KB oleh TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) meningkatkan ekspresi Nos2 dan produksi NO. Efek TNF-alpha pada ROS dan RNS merangsang radikal ini untuk meningkatkan ekspresi TNF-alpha dan menghasilkan peningkatan peradangan. Aktivasi dari p38 MAPKs terlibat dalam upregulasi mediator inflamasi, termasuk TNF-alpha, iNos, dan siklooksigenase-2 (COX-2). Protein penting lainnya yang terlibat adalah NF-KB, NF-KB terbukti dalam kontribusinya dalam ekspresi gen TNF-alpha dan Nos2. Aktivasi NF-KB memengaruhi fosforilasi p65, ubiquitinasi, fosforilasi dan degradasi IKBalpha. Dalam hal ini diketahui betanin mampu menurunkan ekspresi dari Tnf-alpha dan Nos2 (Ahmadi *et al*, 2020).



Gambar 2.23. Mekanisme betanin dalam proses apoptosis (Hadipour et al., 2020)

Penelitian yang dilakukan oleh Thong-asa et al., 2023 mengatakan pretreatment dengan betanin 100 mg/kg menyebabkan penurunan yang signifikan pada infark otak dan MDA, CA1 hippocampus. Betanin juga mampu meningkatkan aktivitas CAT secara signifikan dengan mengurangi tingkat glutathione (Thong-asa et al., 2023). Betanin juga mampu menahan asam lambung dan tetap stabil. Betanin adalah senyawa heterosiklik nitrogen yang larut dalam air, betanin mampu secara pasif berdifusi ke seluruh epitel usus tanpa merubah struktur kimia. Betanin diketahui sebagai anti apoptosis melalui inhibisi SAPK/JNK dan P13K (Thong-asa et al., 2023). Penelitian yang

dilakukan oleh Naim Abedimanesh tahun 2021 mengatakan pemberian 10, 20 mg/kg.b.w dan 40 mg/kg. b.w. betanin pada Tikus Wistar yang diberikan Streptozocin (STZ) untuk menginduksi diabetes, pemberian 20 mg/kg.b.w dan 40 mg/kg. b.w adalah dosis yang paling efektif meningkatkan level insulin melalui meningkatkan glucose tolerance test ($P < 0,001$) dan perubahan histopatologi dengan secara signifikan melalui meningkatkan regulasi AMPK dan SIRT1 serta menurunkan NF- κ B mRNA ($p < 0,05$) (Abedimanesh et al., 2021).



Gambar 2.24. Mekanisme betanin sebagai antioksidan dalam stress oksidatif (Phukan et al., 2023)

Penelitian lain dengan pemberian Betanin di dalam ekstrak Umbi Bit dilakukan oleh Nugraha et al pada tahun 2019 mendapatkan hasil

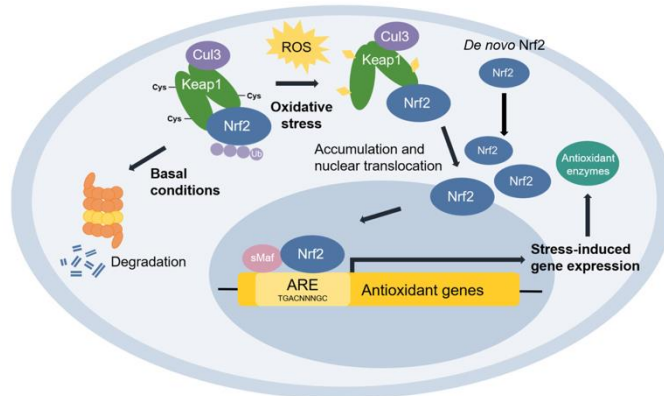
bahwa pemberian dosis 100, 200, dan 400 mg selama 15 hari dibandingkan dengan pemberian vitamin E 100 mg/kgBB, pemberian dosis 100 mg/kgBB mampu memperbaiki kadar kreatinin dan profil lipid dan pada dosis 200 mg/kg BB memperbaiki kadar serum SGOT dan SGPT dibandingkan dengan kontrol negatif ($P < 0,05$).

2.4 Vitamin C

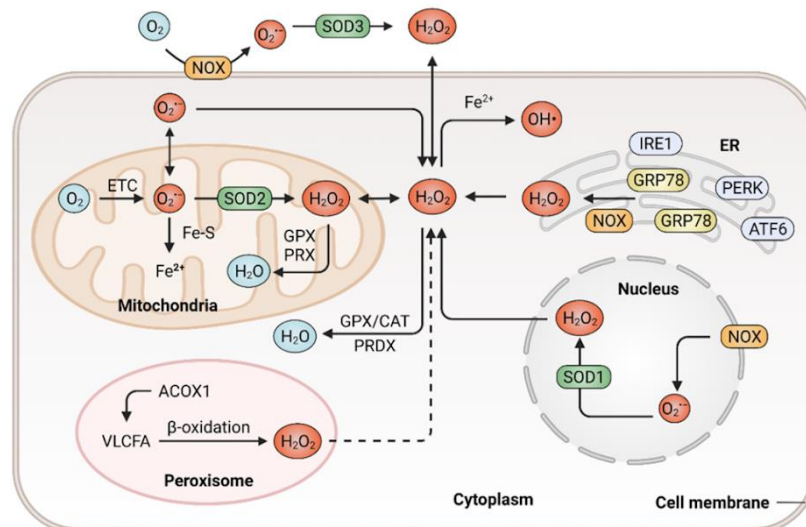
Vitamin C adalah antioksidan kuat dan memiliki fungsi mengikat radikal bebas. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Arifuddin et al pada tahun 2016 mengatakan bahwa pemberian vitamin C dalam bentuk serbuk yang dimasukkan ke dalam lambung tikus (*Rattus Norvegicus*) melalui oral menggunakan jarum gavage dengan dosis 50mg/kgBB/hari setelah 4 minggu dilakukan pemeriksaan histopatologi dengan pembedahan untuk mendapatkan organ hati. Kerusakan sel hati tikus tersebut dibagi menjadi 4 kelompok yaitu: sel normal, degenerasi parenkimatos, degenerasi hidropik dan nekrosis. Hasil dari penelitian tersebut menyebutkan bahwa pemberian dosis 50 mg/kgBB/hari dan 75 mg/kgBB/hari adalah sama efektifnya dalam memperbaiki kerusakan struktural jaringan hati. Perlakuan kelompok dengan vitamin C secara signifikan $p < 0,05$ dapat menurunkan kadar enzim

transaminase. Uji Post-Hoc tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna antara pemberian dosis 50 mg/kgBB/hari dan 75 mg/kgBB/ hari dengan nilai $p > 0,05$ (Arifuddin *et al.*, 2016).

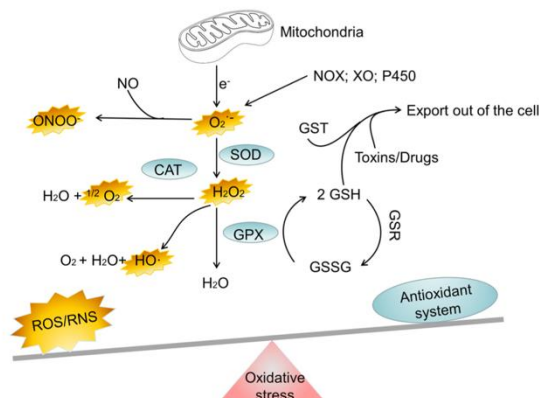
Penelitian yang dilakukan pada tahun 2017 oleh Farhan dan kawan-kawan, Pemberian Vitamin C terhadap gambaran histopatologi tikus Wistar yang terpapar plumbum asetat dengan dosis 50 mg/kgBB/hari dan 75 mg/kgBB/hari pada penelitian tersebut menyebutkan bahwa terdapat perbedaan gambaran histopatologi antara yang diberikan vitamin C dengan kelompok yang tidak diberikan vitamin C. Pemberian dosis 50 mg/kgBB/hari dengan kelompok yang mendapat Vitamin C 75 mg/kgBB/hari memiliki efektifitas yang sama setelah dilakukan pemeriksaan uji Post-Hoc (Farhan *et al.*, 2017).



Gambar 2.25. Mekanisme kerja Vitamin C sebagai antioksidan dalam Keap1-Nrf2 pathway (Ngo and Duennwald, 2022)



Gambar 2.26. Mekanisme Vitamin C sebagai antioksidan termasuk Peroxiredoxin (PRDX), glutathione peroxidase (GPX) dan catalase (CAT) pada Sitosol atau mitokondria yang melakukan hidrolisis dari H₂O₂ menjadi H₂O (Huang et al., 2022)



Gambar 2.27. Mayor oxidant dan antioksidan sistem pada keganasan (Liu et al., 2023)

2.5 Dampak Induksi Formaldehida

Formaldehida adalah senyawa kimia dengan rumus H_2CO , dapat berbentuk gas atau cairan yang disebut formalin, dapat berbentuk padat yang disebut paraformaldehyde. Formaldehida dihasilkan oleh aksi cahaya matahari dan oksigen terhadap metana dan hidrokarbon yang ada di atmosfer. Formaldehyde dapat larut dalam air (misalnya 37% disebut formalin). Formaldehyde dapat dioksidasi oleh oksigen atmosfer menjadi asam format (National Center for Biotechnology Information, 2022).

Kegunaan Formaldehyde adalah untuk disinfektan dan bahan pengawet. Kegunaan lainnya adalah bahan pembuatan sutra sintetis, zat pewarna, cermin dan kaca, sebagai pengeras lapisan gelatin, pembuatan pupuk dalam bentuk urea, bahan pembuatan produk

parfume, bahan pengawet dalam kosmetika dan cat kuku, dan pencegahan korosi. Formalin dapat masuk ke dalam tubuh melalui inhalasi dan paparan langsung ke kulit. Menurut International Programme on Chemical Safety (IPCS) batas toleransi dalam bentuk air adalah 0,1 mg/L. Batas formaldehyde secara inhalasi adalah 0,75 ppm TWA (Time Wiegthed average). Pada beberapa penelitian menyampaikan paparan formaldehyde secara inhalasi sebanyak 0,25 – 0,30 ppm adalah iritasi hidung dan tenggorokkan. Paparan formaldehyde sebanyak 0,1- 3 ppm dalam jangka waktu lama menyebabkan iritasi saluran nafas atas. Pada beberapa penelitian menyebutkan pada level 2,51 ppm pekerja yang terpapar formalin dalam jangka waktu lama dapat mengakibatkan penurunan ventilasi (Oheo, Tosepu and Yasnani, 2020).

Bahaya pada formaldehid disebabkan karena formaldehid merupakan senyawa yang sangat reaktif. Formaldehid memiliki gugus karbonil yang dapat dengan mudah bereaksi dengan gugus -NH₂ yang menyebabkan proses oksidatif fosforilasi terganggu, yang mampu menyebabkan asidosis dan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga terjadi peningkatan produksi radikal bebas. ROS mampu merusak membran sel dari makromolekul, ROS mampu merusak peroksidasi lipid, merupakan suatu reaksi berantai dimana radikal bebas mengikat elektron dari lipid dalam membran sel. Senyawa ini bereaksi dengan asam arakidonat yang merupakan polyunsaturated

omega-6 fatty acid yang terdapat di dalam membran sel. Peningkatan peroksidasi lipid ini akan menyebabkan *stress* oksidatif. Peroksidasi lipid juga akan menghasilkan malondialdehid (MDA) yang merupakan marker *stress* oksidatif. Meningkatnya proses oksidatif merupakan faktor risiko dari kanker. Peningkatan kadar MDA plasma merupakan marker dari suatu keganasan. Efek formaldehyde juga terdapat pada penelitian yang dilakukan oleh Pramono, Soeharto dan Margawati (2012) dapat terjadi degenerasi parenkimatos, degenerasi dan nekrosis pada hepar. Penelitian ini dilakukan pada Tikus wistar dengan pemberian oral dimulai dari 0,019 mL/hari setara dengan 50 mg/kgBB/hari (1/16 dosis letal selama 12 minggu). Penelitian lainnya juga pada tahun 2012 oleh Wibowo dilakukan penelitian dengan hasil pemberian formalin dosis bertingkat selama 12 minggu menyebabkan kerusakan ginjal dan terjadi perubahan struktur histopatologi di bagian tubulus ginjal tikus. Pada penelitian tersebut dosis yang digunakan adalah 50 mg/kgBB/hari, 100 mg/kgBB/hari, 200 mg/kgBB/hari. Dosis Lethal formalin adalah (LD50) 800 mg.kgBB/hari (Wibowo, 2012).

Pada tahun 2014 penelitian yang dilakukan oleh Yu di China pemberian formaldehyde secara inhalasi selama 2 jam per hari selama 15 hari dengan dosis 20, 40, 80 mg/L didapatkan hasil peningkatan MDA pada tikus yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Yu *et al.*, 2014). Pada tahun 2015 penelitian yang dilakukan oleh Wijayanti didapatkan adanya peningkatan ureum dan kreatinin plasma

tikus yang diberikan formalin peroral sebanyak $\frac{1}{4}$ dosis letal formalin selama 2 minggu (Wijayanti, Djamil and Marfua'ti, 2014). Pada tahun 2016 Romdhoni melakukan penelitian pemberian formaldehyde dengan dosis bertingkat pada tikus wistar selama 4 minggu dimulai dari dosis 20 ppm/hari diperoleh hasil adanya fokal hiperkeratosis dan hiperplasia pada permukaan mukosa lambung (Romdhoni, 2016).

Efek jangka pendek terhadap tubuh adalah pada Konsentrasi sebesar 0,1 - 5,0 bpj mampu menyebabkan iritasi hidung dan tenggorokan; 10-20 bpj dapat menyebabkan sulit bernafas, rasa terbakar pada hidung dan tenggorokan, serta batuk; 25-50 bpj dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan kerusakan serius saluran pernafasan seperti radang paru dan edema paru (jarang terjadi). Gejala lain dapat meliputi bersin, nafas berbunyi, radang faring, bronkitis, sakit kepala, disfagia, rasa haus yang amat sangat, letih, palpitasi, mual dan muntah. Pada kadar yang lebih tinggi menimbulkan batuk, sesak nafas, bronkitis, pneumonia, edema dan kejang pada laring dan edema paru. Konsentrasi yang sangat tinggi menyebabkan kematian pada manusia. Reaksi hipersensitif seperti edema laring, bronkitis asma, gangguan trakeobronkitis yang parah, serta biduran, dilaporkan terjadi pada individu yang terpapar sebelumnya (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2008).

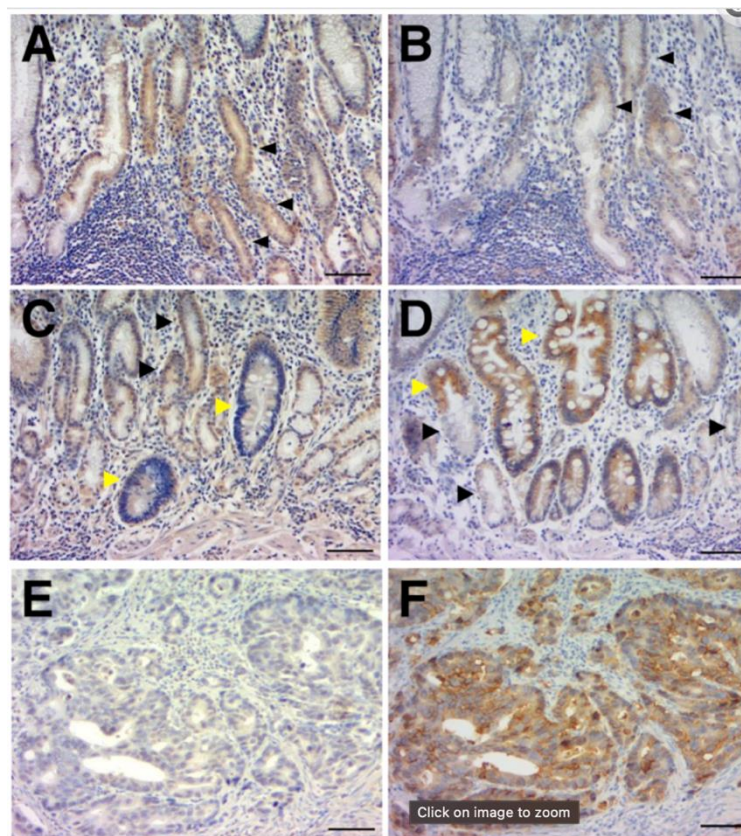
Efek jangka Panjang adalah Paparan secara berulang atau terus-menerus dapat menyebabkan sakit kepala, radang selaput lendir

hidung, mual, ngantuk, kerusakan sistem pernafasan, luka pada ginjal dan sensitisasi pada paru. Efek neurofisiologi meliputi gangguan tidur, iritabilitas, gangguan keseimbangan tubuh, penurunan daya ingat, penurunan daya konsentrasi, dan perubahan suasana hati. Pada wanita terjadi gangguan menstruasi dan kemandulan. Efek reproduktif dilaporkan terjadi pada hewan. Keturunan dari tikus yang terpapar bahan formaldehida selama masa kehamilan, tidak menunjukkan adanya penyimpangan yang dapat terlihat. Jumlah kotoran, durasi kehamilan, dan berat ginjal serta adrenal janin mengalami peningkatan dan berat paru serta hati janin mengalami penyusutan. Paparan formaldehida jangka panjang dilaporkan berhubungan dengan meningkatnya risiko kanker pada hidung, sinus aksesorius, serta kanker nasofaring dan orofaring pada manusia (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2008).

Berdasarkan catatan dari U.S. National Library of Medicine dan Toxicology dampak formaldehyde pada manusia adalah iritasi pada kulit, mata, hidung dan tenggorokkan terjadi pada beberapa individu dengan paparan jangka panjang terhadap konsentrasi formaldehid di udara (Adamović *et al.*, 2021). The U.S National Toxicology Program 15th Report on Carcinogenesis juga menyimpulkan bahwa formaldehyde merupakan karsinogen bagi manusia. Sebelum pernyataan tersebut U.S EPA IRIS program juga menyimpulkan bahwa formaldehyde merupakan karsinogen bagi manusia (National Toxicology Program, 2021).

2.6 Hubungan Displasia Nasofaring, LRIG1 dan EGFR

Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains (LRIG1) merupakan protein transmembrane yang bersifat antagonis dari sinyal Epidermal Growth Factor (EGFR) pada jaringan epitel. Ekspresi dari EGFR akan terdeteksi sebagai trend opposite dari LRIG1 (Ji *et al.*, 2022).



Gambar 2.28. Ekspresi dari Immunohistochemistry (IHC) LRIG1 dan EGFR pada human gastric preneoplastic dan jaringan kanker (Yu *et al.*, 2018)

Gambar A dan B menjelaskan pada *Spasmolytic polypeptide-expressing metaplastic* (SPEM) LRIG1 terekspresi sangat kuat (gambar A)

dan EGFR terekspresi lemah (Gambar B). Gambar C dan E menggambarkan ekspresi LRIG1 yang rendah pada intestinal metaplastic hingga kanker. Gambar D dan F memperlihatkan ekspresi yang kuat dari EGFR pada metaplastic hingga kanker. Deplesi pada LRIG1 dapat menginduksi regulasi dari EGFR dan ekspresi dari protein epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Yu *et al.*, 2018).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Nagata pada Ocular-Surface Squamous Neoplasia yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok 1 tentang papillomadan displasia, kelompok 2 tentang malignansi, dan kelompok 3 tentang squamous cell carcinoma. Keseluruhan kelompok tersebut dilihat dengan menggunakan IHC untuk melihat ekspresi dari LRIG1 dan EGFR. Diketahui LRIG1 terekspresi kuat pada kasus benigna, sedangkan EGFR terekspresi kuat pada kasus maligna (Nagata *et al.*, 2014).

LRIG1 secara bekerja dengan melakukan inhibisi ERBB reseptor family, dan juga sebagai down regulasi dari tyrosin kinase. Termasuk hepatocyte growth factor receptor (MET), proto-oncogen tyrosine-protein kinase receptor (RET) dan platelet derived growth factor receptor alpha. LRIG1 mampu menginhibisi aktivasi dari EGFR, pada satu kali aktivasi dari EGFR maka akan meningkatkan ekspresi dari LRIG1 mRNA. LRIG1 mentrigger degradasi dari EGFR (Succony, 2017).

LRIG1 merupakan regulator negatif terhadap EGFR, dan keduanya berperan dalam menekan tumor. Peran utama dalam menentukan

keganasan suatu tumor pada manusia dipegang erat oleh LRIG1. Bagaimanapun juga, LRIG1 dan EGFR keduanya diduga bekerja satu sama lain melalui ektodomains. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ectodomain soluble pada LRIG1 yang mengandung *domain leucine-rich repeat* memodulasi sinyal EGFR dan aktivitas pertumbuhan serta perkembangan sel. Hal ini didukung juga oleh temuan pada kanker kolon. Pada penelitian yang mendukung ini, terlihat pada kanker colon, knockdown/penurunan LRIG1 menghasilkan aktivasi dari sinyal EGFR serta jalur jalur lainnya yang berkaitan dengan persinyalan tersebut sebagai cara untuk sel menghindari kejadian apoptosis. Berkurang hingga hilangnya ekspresi LRIG1 terlihat juga pada penelitian dengan tipe yang berbeda, yaitu kanker gastrik. Pada kanker gastrik, penurunan kadar LRIG1 diindikasikan terjadi karena EGFR terlihat meningkat. Akibatnya, down-regulation yang terjadi pada LRIG1 akan mempercepat karsinogenesis melalui aktivasi dari EGFR. Penelitian pada tahun 2014 dan 2018 yang dilakukan oleh Shao, dkk serta Zhou, dkk. secara berurutan melaporkan kesimpulan yang mendukung satu sama lain. Penelitian Shao, dkk melaporkan bahwa ekspresi LRIG1 melalui miR-19a memengaruhi pertumbuhan sel glioma. Begitupula penelitian Zhou, dkk melaporkan bahwa *down-regulation* EGFR terhadap penghambatan LRIG1 melalui miR-20a memengaruhi kejadian apoptosis pada sel kanker gastrik. Kedua penelitian ini telah menunjukkan bahwa hubungan displasia, LRIG1 dan EGFR memiliki hubungan yang erat satu sama lain (Yu et al., 2018).

meningkat sehingga terjadi *stress* oksidatif. *Stress* oksidatif mampu mengurangi ekspresi dan kadar LRIG1 yang terdapat didalam tubuh. Berkurangnya LRIG1 sebagai supresor dari proliferasi sel di dalam tubuh mampu memengaruhi kadar EGFR yang merupakan biomarker keganasan. EGFR didalam proses displasia memengaruhi tiga *pathway*, yaitu PI3K/AKT *pathway*, STAT3 *pathway*, dan MAPK *pathway*. EGFR juga mampu menghambat p53, yang merupakan faktor yang sangat berpengaruh dalam proses apoptosis.

Hubungan EGFR dan LRIG1 adalah pada PI3K *pathway* dan MAPK *pathway* melalui gen P13K, Akt, Raf I, dan MEK1. PI3K/AKT *pathway* dan MAPK *pathway* akan berpengaruh terhadap proliferasi sel dan pertumbuhan sel. LRIG1 akan menghambat P13/AKT, RafI dan ERK sehingga mampu memengaruhi dan mengontrol proliferasi dari sel.

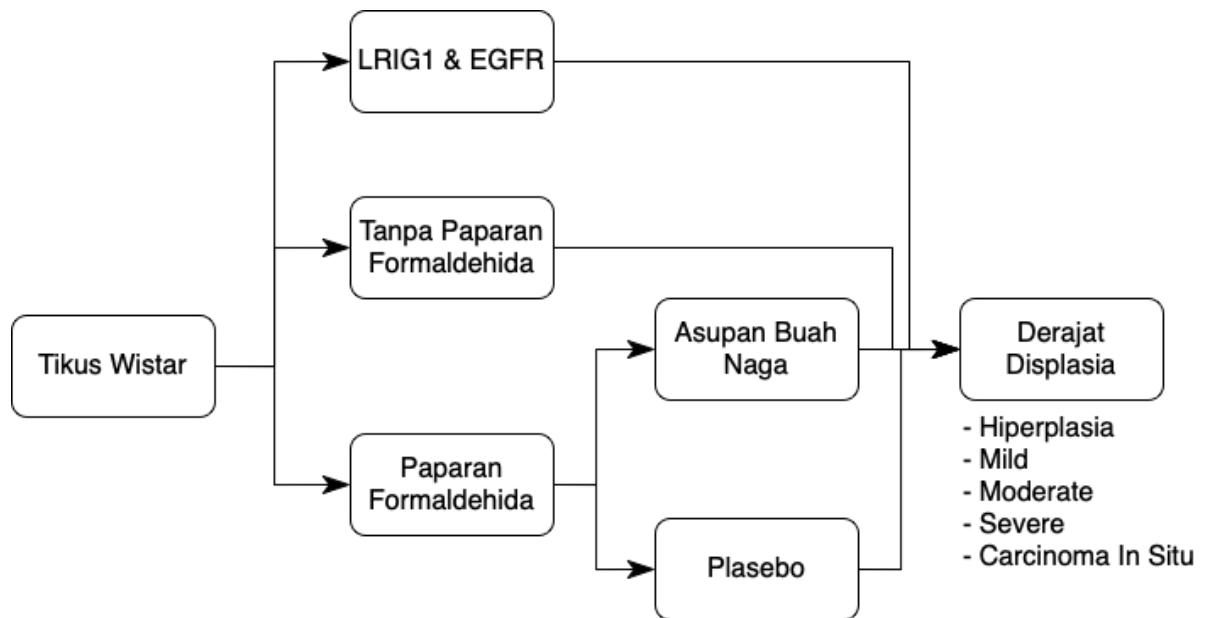
Adanya paparan karsinogenik seperti formaldehid akan memengaruhi kadar dari LRIG1 sehingga kontrol terhadap proliferasi dan pertumbuhan sel menjadi berpengaruh dan tidak terkendali sehingga terjadi displasia. Paparan formaldehida menyebabkan peningkatan ekspresi dan kadar dari EGFR. Pada PI3K/AKT *pathway* EGFR berperan dalam perubahan P13K menjadi PIP3 dan Akt. Ketiga gen tersebut akan memengaruhi cyclin D yang akan berpengaruh terhadap proliferasi sel. Pada MAPK *pathway*, EGFR akan berpengaruh terhadap Raf I, MEK1, ERK, dan PAK1, dalam proliferasi dan pertumbuhan sel sehingga meningkatnya ekspresi dan kadar EGFR

dalam tubuh karena induksi formaldehid akan meningkatkan proliferasi sel, pertumbuhan sel dan menurunkan apoptosis sel.

Isolate Betanin sebagai antioksidan mampu menghambat ROS sehingga radikal bebas menjadi menurun, pencegahan *stress* oksidatif, ekspresi dan kadar EGFR tidak meningkat, tidak ada penghambatan terhadap p53, dan apoptosis terjadi. Dengan pemberian isolate betanin, P13K/AKT *pathway*, STAT3 *pathway*, dan MAPK *pathway* tidak terjadi, sehingga displasia data dicegah dengan mengatur proliferasi dan pertumbuhan sel.

Pemberian isolate betanin mampu mencegah terjadinya ROS dan *stress* oksidatif sehingga memengaruhi ekspresi dan kadar LRIG1 menjadi stabil / normal. Dengan ekspresi dan kadar LRIG1 yang stabil, P13K/AKT *pathway* dan MAPK *pathway* mampu tercegah dan displasia tidak terjadi.

2.9 Kerangka Konseptual



Gambar 2.30. Kerangka konseptual

Isolate
Betanin