

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI PIRFENIDON DAN
5-FLUOROURASIL TERHADAP PROLIFERASI FIBROBLAS KELOID**

Studi In Vitro Terhadap Kadar pSmad3, TGF- β 1 dan Kolagen Tipe 1

DISERTASI

**Disusun untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan Mencapai Gelar Doktor
Program Studi Ilmu Kedokteran (S3)**



Oleh

Nugrohoaji Dharmawan

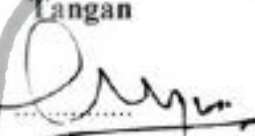


T501208002

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN (S3)
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2021**

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI PIRFENIDON DAN
5-FLUOROURASIL TERHADAP PROLIFERASI FIBROBLAS KELOID**

Studi In Vitro Terhadap Kadar pSmad3, TGF- β 1 dan Kolagen Tipe 1

DISERTASI

	Oleh		
	Nugrohoaji Dharmawan		
	NIM: 1501208002		
	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Komisi Promotor			
Promotor	Prof. Dr. Harijono Ks.dr.,Sp.KK(K) NIP. 1946120720171001		
Ko-Promotor I	Prof. Dr. Bambang Purwanto,dr., Sp.PD-KGH, FINASIM NIP. 194807191976091001		
Ko-Promotor II	Dr. Indah Julianto,dr., Sp.KK(K) NIP. 19488080120162001		

Telah dinyatakan memenuhi syarat
Pada tanggal Januari 2021

Kepala Program Studi Ilmu Kedokteran (S3)
Fakultas Kedokteran UNS



Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp. OG(K)
NIP. 195303311982021003

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI PIRFENIDON DAN
5-FLUOROURASIL TERHADAP PROLIFERASI FIBROBLAS KELOID**

Studi In Vitro Terhadap Kadar pSmad3, TGF- β 1 dan Kolagen Tipe I

DISERTASI

Oleh

**NUGROHOAJI DHARMAWAN
T501208002**

TIM PENGUJI

No	Nama Terang	Jabatan	TTD
1.	Prof. Dr. Ir. Ahmad Yunus, M.S. NIP. 196107171986011001	Ketua Penguji	
2.	Prof. Drs. Sutarno, M.Sc., Ph.D. NIP. 19600809 1986121001	Sekretaris Penguji	
3.	Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp. OG(K) NIP. 19530331 1982021003	Anggota Penguji	
4.	Prof. Dr. Reviono, dr., SpP(K) NIP. 196510302003121001	Anggota Penguji	
5.	Prof. Dr. Harijono Kariosentono, dr., Sp.KK(K) NIP. 1946120720171001	Anggota Penguji	
6.	Prof. Dr. Bambang Purwanto, dr., Sp.PD-KGH., FINASIM NIP. 19480719 1976091001	Anggota Penguji	
7.	Dr. Indah Julianto, dr., Sp.KK(K) NIP. 1948080120162001	Anggota Penguji	
8.	Dono Indarto, dr., M.Biotech.St. Ph.D NIP. 196701041996011001	Anggota Penguji	
9.	Dr. Etik Poncorini P, dr., M.Pd NIP. 197503112002122002	Anggota Penguji	
10.	Dr. Puguh Riyanto, dr., Sp.KK(K) NIP. 197012162008121001	Anggota Penguji	

Telah dipertahankan di hadapan penguji
Pada Ujian Terbuka Promosi Doktor Universitas Sebelas Maret dan dinyatakan telah memenuhi
syarat pada tanggal 26 Januari 2021



Mengetahui,

Rektor Universitas Sebelas Maret Surakarta

Prof. Dr. Jamal Wiwoho, SH, M.Hum
NIP. 196111981987021001

PERNYATAAN KEASLIAN DAN PERSYARATAN PUBLIKASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa:

1. Disertasi yang berjudul: “PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI PIRFENIDON DAN 5-FLUOROURASIL TERHADAP PROLIFERASI FIBROBLAS KELOID” ini adalah karya penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dengan acuan yang disebutkan sumbernya, baik dalam naskah karangan dan daftar pustaka. Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi, baik disertasi beserta gelar doktor saya dibatalkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
2. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi disertasi pada jurnal atau forum ilmiah harus menyertakan tim promotor sebagai author dan PPs UNS sebagai institusinya. Apabila saya melakukan pelanggaran dari ketentuan publikasi ini, maka saya bersedia mendapatkan sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, Januari 2021

Mahasiswa,

Nugrohoaji Dharmawan

T501208002

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI PIRFENIDON DAN 5-FLUOROURASIL TERHADAP PROLIFERASI FIBROBLAS KELOID

Studi In Vitro Terhadap Kadar pSmad3, TGF- β 1 Dan Kolagen Tipe 1

Nugrohoaji Dharmawan
NIM: T501208002

ABSTRAK

Latar Belakang: Keloid adalah penyakit fibro-proliferatif yang ditandai adanya pertumbuhan jaringan ikat abnormal yang melewati batas tepi luka. Etiologi penyakit ini masih belum jelas diketahui. Terapi keloid masih menjadi tantangan hingga saat ini karena sifat rekurensinya yang tinggi. Berbagai terapi dikembangkan akan tetapi belum ada yang memberikan hasil memuaskan. 5-Fluorourasil (5-FU) adalah salah satu terapi pilihan keloid yang sudah lama digunakan tetapi sering menimbulkan efek samping lokal seperti nyeri, sensasi terbakar, dan ulserasi. Pirfenidon (PFD) adalah obat yang mempunyai efek anti fibrotik dan biasanya digunakan pada penyakit fibrosis paru. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian kombinasi PFD dan 5-FU terhadap proliferasi fibroblas keloid dengan mengevaluasi kadar *phosphorylated* Smad3, TGF- β 1 dan kadar kolagen tipe 1.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian *in vitro* dengan *post-test only control group design*. Sampel sel fibroblas didapatkan dari 3 penderita keloid dan dikultur hingga pasase VII. Terapi PFD 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml dan kombinasi keduanya diberikan pada kultur sel fibroblas. Setelah 72 jam, proliferasi fibroblas diukur dengan 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, sedangkan kadar pSmad3, TGF- β 1 dan kolagen tipe 1 diukur dengan *Enzym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Perbedaan rerata antar kelompok perlakuan diuji dengan *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan nilai signifikansi $p < 0.05$.

Hasil: Kombinasi PFD-1.5/5-FU dapat menghambat proliferasi fibroblas ($26.57 \pm 10.22\%$; $p = 0.002$) dibandingkan dengan kontrol dan PFD ($67.58 \pm 17.97\%$) dan menurunkan kadar pSmad3 (182.77 ± 61.98 pg/ml) dibandingkan dengan kontrol (315.16 ± 34.47 pg/ml; $p = 0.006$) dan 5FU (175.16 ± 48.76 pg/ml; $p = 0.028$) Pemberian terapi kombinasi PFD-1.5/5-FU menurunkan kadar TGF- β 1 (294.89 ± 32.41 ; $p = 0.175$) dan kolagen tipe 1 (0.422 ± 0.037 ; $p = 0.111$) tetapi tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol, PFD dan 5-FU.

Kesimpulan: Kombinasi PFD/5-FU dapat menghambat proliferasi sel fibroblas melalui penurunan kadar pSmad3 pada keloid fibroblas.

Kata kunci: Keloid, pirfenidon, 5-FU, proliferasi fibroblas, pSmad3, TGF- β 1, kolagen tipe 1.

THE EFFECT OF PIRFENIDONE IN COMBINATION WITH 5-FLUOROURACIL ON KELOID FIBROBLAST PROLIFERATION

In Vitro Study of pSmad3, TGF- β 1 and Collagen Type 1 Levels

Nugrohoaji Dharmawan
NIM: T501208002

ABSTRACT

Background: Keloid is a fibro-proliferative disease that develops tissue that crosses the wound border. The etiology of this disease is still unclear. Keloid therapy is still a challenge today because of its high recurrence. Various therapies have been developed but none of them have yielded satisfactory results. 5-Fluorouracil (5-FU) is a therapy of choice for keloids that has long been used but often causes local side effects such as pain, burning sensation, and ulceration. Pirfenidone (PFD) is a drug that has anti-fibrotic effects and is usually used in pulmonary fibrosis. This study aims to analyze the effect of the combination of PFD and 5-FU on the proliferation of keloid fibroblasts with phosphorylation levels of phosphorylated Smad3, TGF- β 1, and levels of collagen type 1.

Methods: This study was an in vitro study with a post-test only control group design. Fibroblast cell samples were obtained from 3 keloid patients and cultured until passage VII. PFD therapy of 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml, and a combination of exercises administered to fibroblast cell cultures. After 72 hours, fibroblast proliferation was measured with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, whereas levels of pSmad3, TGF- β 1, and collagen type 1 were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The mean difference between treatment groups was tested by one-way Analysis of Variance (ANOVA) with a significance value of $p < 0.05$.

Results: The combination of PFD-1.5/5-FU can inhibit fibroblast proliferation ($26.57 \pm 10.22\%$; $p = 0.002$) compared to control and PFD ($67.58 \pm 17.97\%$) and reduce pSmad3 levels (182.77 ± 61.98 pg/ml) compared to controls (315.16 ± 34.47 pg/ml; $p=0.006$) and 5FU (175.16 ± 48.76 pg/ml; $p=0.028$) Giving combination therapy PFD-1.5/5-FU decreased TGF- β 1 levels (294.89 ± 32.41 ; $p=0.175$) and collagen type 1 (0.422 ± 0.037 ; $p=0.111$) but not significant compared with controls, PFD and 5-FU.

Conclusion: PFD/5-FU combination can inhibit fibroblast cell proliferation by decreasing pSmad3 levels in keloid fibroblasts.

Keywords: Keloid, pirfenidone, 5-FU, fibroblast proliferation, pSmad3, TGF- β 1, collagen type 1.

RINGKASAN DISERTASI

commit to user

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI PIRFENIDON DAN 5-FLUOROURASIL TERHADAP PROLIFERASI FIBROBLAS KELOID

Studi In Vitro Terhadap Kadar pSmad3, TGF- β 1 Dan Kolagen Tipe 1

Nugrohoaji Dharmawan

NIM: T501208002

Keloid merupakan salah satu kelainan yang sering dijumpai pada masyarakat dan menimbulkan gangguan baik secara fungsi maupun secara kosmetik. Penyakit ini berbeda dengan hipertrofik skar karena pada keloid ditandai adanya pertumbuhan jaringan ikat yang berlebihan hingga melewati batas tepi luka pada kulit yang sebelumnya mendapat trauma. Patogenesis keloid belum jelas dipahami hingga saat ini, tetapi berbagai penelitian menunjukkan adanya gangguan dalam proses penyembuhan luka sehingga menyebabkan deposisi kolagen yang berlebihan. Beberapa *growth factor* juga berperan penting dalam patogenesis keloid. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) merupakan salah satu *growth factor* yang sangat penting dalam proses fibrosis termasuk pada keloid. *Transforming growth factor- β* ini mempunyai berbagai jalur dalam proses fibrosis, salah satunya adalah melalui jalur utama Smad.

Keloid memiliki angka rekurensi yang tinggi sehingga para ahli terus mengembangkan terapi yang efektif untuk penanganan keloid. Berbagai terapi kombinasi terus dikembangkan untuk menggantikan terapi dengan kortikosteroid yang memiliki banyak efek samping. Pirfenidon adalah obat anti fibrosis yang sudah sering digunakan untuk penanganan fibrosis paru idiopatik. Obat ini memiliki efek anti inflamasi dan anti fibrosis sedangkan 5-FU adalah obat kemoterapi yang sudah digunakan untuk terapi keloid. Obat ini bekerja sebagai obat anti metabolik dengan menghambat timedilat sintase yang menghambat sintesis RNA.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian kombinasi PFD dan 5-FU terhadap proliferasi fibroblas keloid. Kombinasi kedua obat ini akan dinilai berdasarkan kadar pSmad3, TGF- β 1, dan kolagen tipe 1.

Rancangan penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *post-test only control group design*. Sampel penelitian ini menggunakan sel fibroblas dari 3 pasien keloid sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Fibroblas keloid ini kemudian dikultur hingga pasase VII kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yaitu;

- Kelompok I : kelompok kontrol tanpa pemberian terapi.
- Kelompok II : diberikan PFD 1.5 mg/ml.
- Kelompok III : diberikan 5-FU 1 mg/ml.
- Kelompok IV : diberikan kombinasi PFD-1.5/5-FU.

Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur fibroblas kemudian diberi terapi dengan PFD 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml dan kombinasi PFD-1.5/5-FU. Pemeriksaan kadar pSmad3, kadar TGF- β 1, kadar kolagen tipe 1 dan proliferasi fibroblas keloid dilakukan setelah 72 jam inkubasi. Kadar pSmad3, TGF- β 1 dan kolagen tipe 1

diukur dengan menggunakan teknik ELISA sedangkan teknik MTT *assay* digunakan untuk mengetahui proliferasi sel-sel fibroblas. Analisis data menggunakan *software* SPSS 21.0 dengan menggunakan uji ANOVA dilanjutkan uji *post hoc* LSD. Hasil penelitian memperlihatkan sebagai berikut:

1. Pemberian kombinasi PFD 1.5 mg/ml dan 5-FU 1 mg/ml menurunkan secara signifikan kadar pSmad3 lebih kuat dibandingkan dengan kelompok kontrol dan 5-FU dosis tunggal.
2. Pemberian kombinasi PFD 1.5 mg/ml dan 5-FU 1 mg/ml menurunkan kadar TGF- β 1 lebih kuat dibandingkan dengan kelompok kontrol, PFD-1.5 dan 5-FU dosis tunggal tetapi tidak signifikan secara statistik.
3. Pemberian kombinasi PFD-1.5/5-FU menurunkan kadar kolagen tipe 1 lebih kuat dibandingkan dengan kelompok kontrol, PFD-1.5 dan 5-FU dosis tunggal tetapi tidak signifikan secara statistik.
4. Pemberian kombinasi PFD-1.5/5-FU dapat menekan proliferasi fibroblas secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan PFD-1.5 dosis tunggal.

Fosforilasi Smad3 berperan penting dalam patogenesis keloid sehingga penghambatan pSmad3 dapat menurunkan produksi kolagen (Andrews *et al.*, 2016). Pirfenidon 1.5 mg/ml pada penelitian ini dapat menghambat pSmad3 paling kuat dibandingkan kelompok kontrol dan perlakuan lainnya. Kombinasi antara PFD-1.5/5-FU menempati urutan kedua yang dapat menghambat pSmad3 dibandingkan dengan kontrol dan pemberian 5-FU saja. Hal ini membuktikan bahwa PFD dapat menghambat jalur Smad sedangkan 5-FU menghambat aktivitas enzim timidilat sintase yang mengganggu sintesis DNA/RNA. Oleh karena itu, kombinasi PFD-1.5/5-FU tidak meningkatkan kemampuan dalam menghambat pSmad3 yang lebih kuat daripada pemberian 5-FU dosis tunggal. Kombinasi antara PFD-1.5/5-FU tidak signifikan secara statistik dalam menurunkan kadar TGF- β 1 dan kolagen tipe 1.

Isolasi fibroblas keloid tidak selalu menghasilkan peningkatan jumlah kolagen sehingga mekanisme terbentuknya keloid tidak mudah untuk dijelaskan hanya berdasarkan peningkatan sintesis kolagen dari fibroblas keloid. Peningkatan sintesis kolagen fibroblas keloid juga dihubungkan dengan adanya stimulasi dari sintesis non-kolagen protein sehingga sintesis kolagen tetap pada kadar yang terkontrol (Ala-Kokko *et al.*, 1987). Beberapa studi memberi induksi dengan TGF- β 1 pada fibroblas keloid untuk memicu proses fibrosis sebelum diberikan perlakuan. Wakefield *et al.*, juga menyatakan bahwa peningkatan TGF- β 1 belum dapat dipastikan sebagai penyebab ataupun efek yang berperan dalam patofisiologi keloid.

Perbedaan siklus sel dibagian tepi dan tengah dari lesi keloid, pengaruh *prolyl 4-hydroxylase* (PH) dan *galactosylhydroxylsyl glucosyltransferase* (GGT) sebagai enzim katalisator biosintesis kolagen dan beberapa faktor lain juga mempengaruhi ekspresi TGF- β 1 dan sintesis kolagen tipe 1.

Selain itu, hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa kombinasi PFD-1.5/5-FU dapat menekan secara signifikan proliferasi fibroblas lebih kuat dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa penghambatan proliferasi fibroblas oleh 5-FU melalui mekanisme lain, yaitu

penghambatan aktivitas enzim timidilat sintase. Dengan demikian, kedua obat tersebut bekerja secara sinergi dalam menghambat proliferasi fibroblas pada keloid meskipun perlu pembuktian lebih lanjut untuk mengetahui keterlibatan jalur lain.

Berdasarkan hasil penelitian diatas, kombinasi kedua obat ini dapat memberikan harapan baru sebagai salah satu terapi pilihan selain kortikosteroid. Penelitian lanjutan sangat diperlukan untuk mencari dosis kombinasi yang efektif dan mencari faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian ini.



A SUMMARY OF DISSERTATION

EFFECT OF COMBINATION PIRFENIDON AND 5-FLUOROURASIL ON FIBROBLAST KELOID PROLIFERATION

An In Vitro Study on pSmad3, TGF- β 1 Dan Kolagen Tipe 1 Levels

Nugrohoaji Dharmawan

NIM: T501208002

Keloid is a disorder that is often found in society and causes both function and cosmetic disturbances. This disease differs from hypertrophic scar because keloids are characterized by an overgrowth of connective tissue that extends beyond the edge of the wound on the skin that was previously traumatized. The pathogenesis of keloids has not been clearly understood at this time, but various studies have shown that there is a disruption in the wound healing process that causes excessive collagen deposition. Several growth factors also play an important role in the pathogenesis of keloids. Transforming growth factor- β (TGF- β) is one of the most important growth factors in the process of fibrosis, including keloids. Transforming growth factor- β has various pathways in the fibrosis process, one of which is through the main Smad route.

Keloid has a high recurrence rate so that experts continue to develop effective therapies for the management of keloids. Various combination therapies continue to be developed to replace therapy with corticosteroids which have many side effects. Pirfenidone is an anti-fibrosis drug that has been frequently used for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. This drug has anti-inflammatory and anti-fibrosis effects while 5-FU is a chemotherapy drug that has been used for keloid therapy. This drug works as an anti-metabolic drug by inhibiting thymidylate synthase which inhibits RNA synthesis.

The aim of this study was to analyze the effect of giving a combination of PFD and 5-FU on the proliferation of keloid fibroblasts. The combination of these two drugs will be assessed based on levels of pSmad3, TGF- β 1, and collagen type 1.

The study design was a laboratory experimental study with a post-test only control group design. The sample of this study used fibroblasts from 3 keloid patients according to inclusion and exclusion criteria. These keloid fibroblasts were then cultured up to passage VII then divided into 4 groups, namely;

- Group I : a control group without therapy.
- Group II : given PFD 1.5 mg/ml.
- Group III : given 5-FU 1 mg/ml.
- Group IV : given a combination of PFD-1.5/5-FU.

After incubation for 48 hours, fibroblast cultures were then treated with PFD 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml, and combination PFD-1.5 / 5-FU. The examination of pSmad3 levels, TGF- β 1 levels, collagen type 1 levels, and the proliferation of keloid fibroblasts were carried out after 72 hours of incubation. The levels of pSmad3, TGF- β 1, and collagen type 1 were measured using the ELISA technique, while the MTT assay technique was used to determine the proliferation of fibroblasts. Data analysis using SPSS 21.0 software using ANOVA test followed by LSD post hoc test. The results of the study show the following:

1. The combination of PFD 1.5 mg/ml and 5-FU 1 mg/ml significantly reduced pSmad3 levels more strongly than the control group and the single-dose 5-FU.
2. The combination of PFD 1.5 mg/ml and 5-FU 1 mg/ml decreased TGF- β 1 levels stronger than the control group, single-dose PFD-1.5, and 5-FU but not statistically significant.
3. The combination of PFD-1.5 / 5-FU reduces collagen levels type 1 was stronger than the control group, single-dose PFD-1.5, and 5-FU but not statistically significant.
4. The combination of PFD-1.5 / 5-FU significantly suppressed fibroblast proliferation compared with the control group and single-dose PFD-1.5.

Phosphorylation of Smad3 plays an important role in the pathogenesis of keloids so that inhibition of pSmad3 can reduce collagen production (Andrews et al., 2016). Pirfenidone 1.5 mg/ml in this study could inhibit pSmad3 the most strongly than the control and other treatment groups. The combination of PFD-1.5 / 5-FU ranks second that can inhibit pSmad3 compared to control and administration of 5-FU alone. This proves that PFD can inhibit the Smad pathway while 5-FU inhibits the activity of the thymidylate synthase enzyme which interferes with DNA / RNA synthesis. Therefore, the combination PFD-1.5 / 5-FU did not increase the ability to inhibit pSmad3 which was stronger than the administration of 5-FU single dose.

The combination of PFD-1.5 / 5-FU was not statistically significant in reducing levels of TGF- β 1 and collagen type 1. Isolation of keloid fibroblasts does not always result in an increase in the amount of collagen so that the mechanism of keloid formation is not easy to explain based solely on the increased collagen synthesis from keloid fibroblasts. Increased synthesis of keloid fibrils collagen is also associated with stimulation of non-collagen protein synthesis so that collagen synthesis remains at controlled levels (Ala-Kokko *et al.*, 1987). Several studies have given induction with TGF- β 1 on keloid fibroblasts to trigger the fibrosis process before treatment. Wakefield et al., Also stated that the increase in TGF- β 1 cannot be ascertained as a cause or effect that plays a role in the pathophysiology of keloids. The differences in the cell cycle at the periphery and middle of keloid lesions, the influence of prolyl 4-hydroxylase (PH) and galactosyl-hydroxylysyl glucosyltransferase (GGT) as enzymes that catalyze collagen biosynthesis, and several other factors also influence TGF- β 1 expression and collagen type 1 synthesis. In addition, the results of this study also show that the combination of PFD-1.5 / 5-FU can significantly suppress fibroblast proliferation more strongly than other treatment groups. This suggests that 5-FU inhibits fibroblast proliferation

through another mechanism, namely inhibition of the activity of the thymidylate synthase enzyme. Thus, the two drugs work synergistically in inhibiting the proliferation of fibroblasts in keloids, although further evidence is needed to determine the involvement of other pathways.

Based on the results of the above research, the combination of these two drugs can provide new hope as an alternative therapy besides corticosteroids. Further research is needed to find an effective dose combination and look for other factors that can influence the results of this study.



KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala karunia dan ridho-Nya, sehingga disertasi dengan judul “Pengaruh Pemberian Kombinasi Pirfenidon Dan 5-Fluorourasil Terhadap Proliferasi Fibroblas Keloid” ini dapat diselesaikan. Disertasi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Selesaiannya disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Jamal Wiwoho, SH, M.Hum selaku Rektor Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
2. Prof. Drs. Sutarno, MSc, Ph.D, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan kesempatan kepada penulis menjadi mahasiswa Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
3. Prof. Dr. Reviono, dr., Sp.P(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan izin belajar kepada penulis untuk menempuh studi S3 di Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
4. Dr. Cahyono Hadi, dr., Sp.OG(K), selaku Direktur RSUD dr. Moewardi Surakarta yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis sebagai dosen pendidik dan pelayanan medik di RSUD dr. Moewardi.
5. Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp.OG(K), selaku Kepala Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta yang selalu memberikan motivasi dan dorongan kepada penulis.

6. Prof. Dr. Harijono Kariosentono, dr., Sp.KK(K), FINS DV, FAADV, selaku promotor yang selalu membimbing, memberi semangat dan dorongan kepada penulis agar bisa menyelesaikan pendidikan Doktor ini.
7. Prof. Dr. Bambang Purwanto, dr., Sp.PD-KGH, FINASIM, selaku *co-promotor* I yang selama ini tidak lelah untuk membimbing, mengingatkan dan memberikan dorongan yang tidak henti-hentinya agar penulis bisa menyelesaikan pendidikan Doktor ini disaat-saat kritis.
8. Dr. Indah Julianto, dr., Sp.KK(K), FINS DV, FAADV, selaku *co-promotor* II yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan serta memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat melakukan penelitian di laboratorium Dermama Surakarta.
9. Segenap anggota dewan penguji: Prof. Dr. Ir. Ahmad Yunus, M.S, selaku ketua tim penguji, Dono Indarto, dr., M. Biotech.St, Ph.D, dan Dr. Etik Poncorini P, dr., M.Pd dari Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Universitas Sebelas Maret Surakarta serta Dr. Puguh Riyanto, dr., Sp.KK(K), FINS DV, FAADV dari Bagian Ilmu Dermatovenereologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang , yang telah banyak memberikan koreksi, masukan, dan saran demi perbaikan penulisan disertasi ini.
10. Segenap dosen Program Studi Ilmu kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah banyak memberikan bekal ilmu pengetahuan, wawasan, dan pengalaman belajar yang sangat bermanfaat selama masa pendidikan.
11. Ayahandaku Prof. Dr. Soenarwan (alm) yang menjadi panutan hidup penulis dan ibunda Ismiyati Soenarwan, serta ayah mertua dr. Soemarsono, MHA dan ibu mertua Edi Rochmani yang selalu menyempatkan doa yang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan Doktor ini.
12. Istriku tercinta dr. Fitria Maharani serta anak-anakku Rashaun Rabindra Dharmawan dan Arshavin Ramazzan Dharmawan yang menjadi semangat bagi penulis untuk tetap bertahan dalam menyelesaikan pendidikan Doktor ini meskipun berbagai masalah silih berganti berdatangan.

13. Kakak dan adik-adikku dr. Tri Budiyo,Sp.U, dr.Yenni Apriana, MPH, Muh. Ardian Yanuaji, SE, dr. Lenny Yusnita, dr. Muh. Bayuaji Meiarso, Sp.OT terima kasih atas dukungannya selalu.
 14. Semua teman sejawat di bagian Dermatovenereologi RSUD dr. Moewardi/Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberi dukungan dan kerjasamanya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan Doktor.
 15. Kepada dr. Agung Triana, Sp.DV, dr. Mardiana, dr. Budi Eko Prasetyarini, dr. Siti Efrida Fiqnasyani, dr. Mina Hasniah, dr. Anindya Oktafiani dan mbak Yenni Astuti AMD yang banyak membantu selama penelitian ini.
 16. Kepada semua PPDS Dermatovenereologi, paramedis, Staf penunjang di Bagian Dermatovenereologi RSUD dr. Moewardi dan semua pihak yang selalu memberi doa dan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan Doktor.
 17. Segenap staf sekretariat Program Studi Ilmu Kedokteran (S3) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah banyak membantu dalam proses belajar mulai dari awal masuk sampai penulis dapat menyelesaikan pendidikan Doktor.
 18. Segenap staf laboratorium Dermama Surakarta dan staf laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret yang telah memfasilitasi dan membantu penelitian disaat badai pandemi Covid-19 berlangsung.
 19. Seluruh teman sejawat seperjuangan peserta didik Program Studi Sains Kedokteran (S3) Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta yang tidak pernah lelah saling memberi semangat dalam menjalani pendidikan.
- Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih banyak kekurangan, untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan disertasi ini.

Surakarta, Januari 2021

DAFTAR ISI

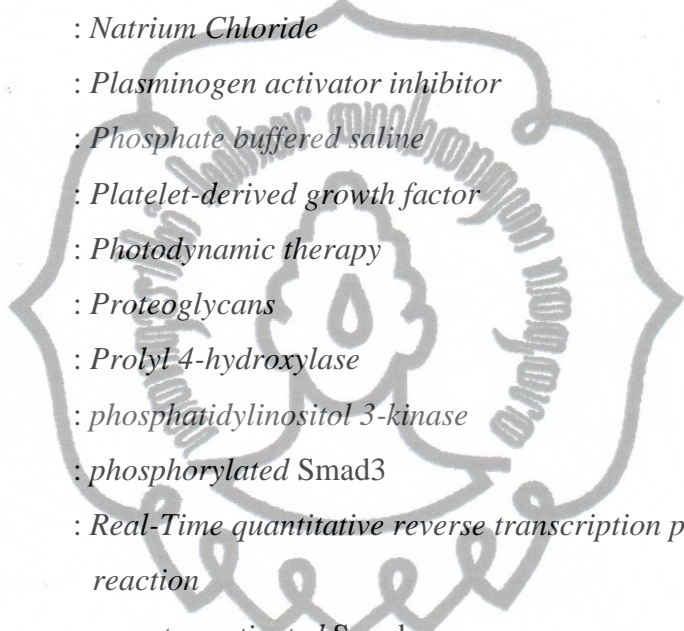
	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN LEMBAR PENGESAHAN SEMINAR HASIL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN UJIAN SEMINAR HASIL	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DAN PERSYARATAN PUBLIKASI.....	iv
Abstrak	v
Ringkasan Disertasi	vii
Kata Pengantar	xiii
Daftar Isi	xvi
Daftar Singkatan.....	xix
Daftar Gambar.....	xxii
Daftar Tabel	xxiii
Daftar Lampiran	xxiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Kebaharuan Penelitian.....	5
C. Rumusan Masalah.....	7
D. Tujuan Penelitian	7
E. Manfaat Penelitian	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Landasan Teori.....	9
1. Definisi Keloid	9
2. Insidensi Keloid.....	10
3. Gejala Klinis Keloid.....	11
4. Histopatologi Keloid	12
5. Prinsip Dasar Penyembuhan Luka	12
6. Etiologi dan Patogenesis Keloid	16
a. Faktor Genetik dan Immunologi	17

b. Faktor Endokrin	18
c. Keloid dan Melanosit	19
d. Faktor Ketidakseimbangan Apoptosis	20
e. Golongan Darah	21
f. Lesi Kulit	21
g. <i>Growth Factor</i>	21
h. Matriks Ekstraseluler	25
7. Terapi Keloid	30
a. Kortikosteroid	31
b. <i>5-Fluorouracil</i>	31
c. Imiquimod	33
d. Kalsineurin <i>Inhibitor</i>	34
e. Laser	34
f. <i>Photodynamic therapy</i>	34
g. Bedah Eksisi	35
h. Kompresi	36
i. Pirfenidon	36
B. Kerangka Teori	40
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	42
A. Kerangka Konseptual	42
B. Hipotesis	43
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN	44
A. Rancangan Penelitian	44
B. Tempat dan Waktu Penelitian	44
C. Populasi dan Sampel Penelitian	44
D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	46
E. Variabel Penelitian	47
F. Definisi Operasional Variabel	48
G. Alat dan Bahan Penelitian	49
H. Tata Laksana Penelitian	50
I. Analisis Hasil Penelitian	58

J. Etika penelitian.....	58
K. Alur Penelitian.....	59
BAB V. HASIL dan PEMBAHASAN.....	61
A. Hasil Penelitian	61
1. Pemeriksaan Proliferasi Fibroblas dengan MTT Assay.....	62
2. Pemeriksaan Kadar pSmad3 dengan ELISA	64
3. Pemeriksaan Kadar TGF- β 1 dengan ELISA	67
4. Pemeriksaan Kadar Kolagen tipe 1 dengan ELISA.....	69
B. Pembahasan.....	71
1. Pendekatan Prinsip Ontologi	71
a. Proliferasi Fibroblas.....	76
b. Kadar Smad3.....	79
c. Kadar TGF- β 1 dan Kolagen tipe 1	81
2. Pendekatan Prinsip Epistemologi	85
3. Pendekatan Prinsip Aksiologi	90
4. Nilai Kebaharuan Penelitian	91
5. Keterbatasan Penelitian.....	92
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	94
A. Kesimpulan	94
B. Implikasi.....	94
1. Teoritis	94
2. Praktis	94
C. Saran.....	95
DAFTAR PUSTAKA.	96
LAMPIRAN	106

DAFTAR SINGKATAN

5-FU	: <i>5- fluorouracil</i>
α -SMA	: <i>Alpha smooth muscle actin</i>
AP-1	: <i>Activator protein 1</i>
ATF-2	: <i>Activating transcription factor-2</i>
Co-Smad	: <i>common mediator Smad</i>
CTGF	: <i>Connective tissue growth factor</i>
DHFU	: <i>Dihydrofluorouracil</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPD	: <i>Dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
dTMP	: <i>Deoxythymidine mono-phosphate</i>
EIA	: <i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	: <i>Enzym-linked Immunosorbent assay</i>
Er:YAG	: <i>Erbium-doped yttrium aluminium garnet</i>
ERK	: <i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FDA	: <i>Food Drug Association</i>
FdUMP	: <i>Fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
FdUTP	: <i>Fluorodeoxyuridine triphosphate</i>
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
FUTP	: <i>Fluorouridine triphosphate</i>
GGT	: <i>Galactosylhydroxylsyl glucosyltransferase</i>
HCL	: <i>Hydrochloric acid</i>
HLA	: <i>Human leucocyte antigen</i>
I-Smad	: <i>Inhibitory Smad</i>
IFN- α	: <i>Interferon alpha</i>
IGF-I	: <i>Insulin-like growth factor I</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
IL	: <i>Interleukin</i>



JNK	: <i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
LAP	: <i>Latency associated peptide</i>
LDH	: <i>Lactate dehydrogenase</i>
LLC	: <i>Large latent complex</i>
LTBP	: <i>Latent TGF-β binding protein</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMPs	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
MTT	: <i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyl tetrazolium bromide</i>
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
PAI	: <i>Plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	: <i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDT	: <i>Photodynamic therapy</i>
PGs	: <i>Proteoglycans</i>
PH	: <i>Prolyl 4-hydroxylase</i>
PI3K	: <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pSmad3	: <i>phosphorylated Smad3</i>
qRT-PCR	: <i>Real-Time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
R-Smad	: <i>receptor activated Smad</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SARA	: <i>Smad anchor for reseptor activation</i>
SLC	: <i>Small latent complex</i>
Smad	: <i>Small mothers against decapentaplegic</i>
Sp-1	: <i>simian virus 40 promoter factor one</i>
TA	: <i>Triamcinolone acetonid</i>
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP	: <i>Tissue inhibitor matrix metalloproteinase</i>
TLR	: <i>Toll like receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alpha</i>

tPA	: <i>Tissue plasminogen activator</i>
TRI	: <i>TGF-β receptor I</i>
TRII	: <i>TGF-β receptor II</i>
TS	: <i>Thymidylate synthase</i>
uPA	: <i>Urokinase plasminogen activator</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Fase penyembuhan luka	17
Gambar 2.	Faktor-faktor yang mungkin menjadi penyebab keloid.....	29
Gambar 3.	Sinyal molekular pada keloid	30
Gambar 4.	Jalur metabolisme 5-FU	35
Gambar 5.	Struktur kimia pirfenidon	37
Gambar 6.	Mekanisme molekuler PFD dalam menekan proses fibrosis ...	38
Gambar 7.	Berbagai mekanisme kerja pirfenidon.....	39
Gambar 8.	Kerangka teori	40
Gambar 9.	Kerangka konseptual penelitian	42
Gambar 10.	Fibroblas keloid setelah 72 jam perlakuan	61
Gambar 11.	Hasil proliferasi fibroblas 72 jam setelah terapi.....	64
Gambar 12.	Kadar pSmad3 72 jam setelah terapi	67
Gambar 13.	Kadar TGF- β 1 72 jam setelah terapi.....	69
Gambar 14.	Kadar kolagen tipe 1 setelah 72 jam terapi	71
Gambar 15.	Proses sinyal TGF- β 1Smad	74
Gambar 16.	Rangkuman mekanisme PFD pada hewan coba.....	85

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Kebaharuan penelitian	6
Tabel 2.	Definsi Operasional	48
Tabel 3.	Metode dilusi standar protein	56
Tabel 4.	Uji normalitas data <i>Shapiro-wilk</i> proliferasi fibroblas	62
Tabel 5.	Uji ANOVA proliferasi fibroblas	63
Tabel 6.	Uji <i>post hoc</i> proliferasi fibroblas	63
Tabel 7.	Uji normalitas data <i>Shapiro-wilk</i> kadar pSmad3	65
Tabel 8.	Uji ANOVA kadar pSmad3	65
Tabel 9.	Uji <i>post hoc</i> kadar pSmad3	66
Tabel 10.	Uji normalitas data <i>Shapiro-wilk</i> TGF- β 1	68
Tabel 11.	Uji ANOVA kadar TGF- β 1	68
Tabel 12.	Uji normalitas data <i>Shapiro-wilk</i> kadar kolagen tipe 1	69
Tabel 13.	Uji ANOVA kadar kolagen tipe 1	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat ijin Komite Etika Penelitian.....	106
Lampiran 2.	Proses pengambilan sampel dan penelitian di laboratorium	107
Lampiran 3.	Foto hasil kultur fibroblas 48 jam	109
Lampiran 4.	Jurnal publikasi.....	110

