

ANALISIS MEKANISME MOLEKULAR POTENSIAL 1,25-(OH)₂D₃ TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS SEL CAL27 KARSINOMA SEL SKUAMOSA ORAL MELALUI JALUR PERSINYALAN MRNA P38 α MAPK, COX-2, CASPASE-1 DAN IL-1 β

POTENTIAL MOLECULAR MECHANISM ANALYSIS OF 1,25-(OH)₂D₃ AGAINST PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CAL27 THROUGH P38 α MAPK, COX-2, CASPASE-1 AND IL-1 β SIGNALING PATHWAYS

Oleh:
Indrayadi Gunardi
NPM: 130130180004

DISERTASI

Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Kedokteran
Pada Universitas Padjadjaran
Dengan wibawa Rektor Universitas Padjadjaran
Prof. Dr. Rina Indriastuti, S.E., M.SIE.
Sesuai dengan Keputusan Senat Komisi I / Guru Besar Universitas
Dipertahankan pada tanggal 23 Agustus 2023
Di Universitas Padjadjaran



**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS PADJAJARAN
BANDUNG
2023**

ANALISIS MEKANISME MOLEKULAR POTENSIAL 1,25-(OH)₂D₃ TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS SEL CAL27 KARSINOMA SEL SKUAMOSA ORAL MELALUI JALUR PERSINYALAN MRNA P38 α MAPK, COX-2, CASPASE-1 DAN IL-1 β

POTENTIAL MOLECULAR MECHANISM ANALYSIS OF 1,25-(OH)₂D₃ AGAINST PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CAL27 THROUGH P38 α MAPK, COX-2, CASPASE-1 AND IL-1B SIGNALING PATHWAYS

Oleh:

Indrayadi Gunardi

NPM: 130130180004

DISERTASI

**Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Kedokteran
Pada Universitas Padjadjaran
Dengan wibawa Rektor Universitas Padjadjaran
Prof. Dr. Rina Indrastuti, S.E., M.SIE.
Sesuai dengan Keputusan Senat Komisi I / Guru Besar Universitas
Dipertahankan pada tanggal 23 Agustus 2023
Di Universitas Padjadjaran**



**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS PADJAJARAN
BANDUNG
2023**

ANALISIS MEKANISME MOLEKULAR POTENSIAL 1,25-(OH)₂D₃ TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS SEL CAL27 KARSINOMA SEL SKUAMOSA ORAL MELALUI JALUR PERSINYALAN MRNA P38 α MAPK, COX-2, CASPASE-1 DAN IL-1 β

POTENTIAL MOLECULAR MECHANISM ANALYSIS OF 1,25-(OH)₂D₃ AGAINST PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CAL27 THROUGH P38A MAPK, COX-2, CASPASE-1 AND IL-1B SIGNALING PATHWAYS

Oleh:
Indrayadi Gunardi
NPM: 130130180004

DISERTASI

Untuk memenuhi salah satu syarat ujian
Guna memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Kedokteran ini.
Telah disetujui oleh Tim Promotor pada tanggal
Seperti tertera di bawah ini

Bandung, 13 Oktober 2023



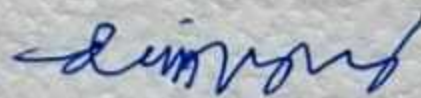
Prof. Dr. Irna Sufiawati, drg., Sp.PM(K).

KETUA TIM PROMOTOR



Hanna Goenawan, dr., M.Kes, AIFO,
Ph.D

ANGGOTA TIM PROMOTOR



Prof. Dr. Dewi Marhaeni Diah
Herawati, drg., M.Si.

ANGGOTA TIM PROMOTOR

ABSTRAK

Pendahuluan: Cisplatin memiliki aktivitas antitumor terhadap berbagai jenis kanker dan merupakan obat pilihan pertama untuk terapi KSS (karsinoma sel skuamosa) oral. Kombinasi cisplatin dan calcitriol (1,25-(OH)₂D₃) memberikan hasil positif terhadap terapi kanker ini.

Tujuan: untuk mengetahui perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAPK, COX-2, caspase-1 dan IL-1 β setelah pemberian calcitriol pada sel CAL27 KSS oral.

Metoda: penelitian laboratorium eksperimental di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran (Januari-Mei 2023) menggunakan sel CAL27, terbagi atas kelompok calcitriol (dosis 4.48, 11.21, 22.43, 44.87 ppm) dan kombinasi cisplatin-calcitriol (dosis 3.69, 9.22, 18.45, 36.91 ppm). Kontrol positif menggunakan cisplatin. Kontrol negatif menggunakan media CAL27 yang tidak diberi perlakuan. Seluruh penanda biologis dilakukan pengujian sebanyak dua kali. Pengukuran IC50 menggunakan uji viabilitas sel. Ekspresi mRNA dievaluasi menggunakan RT-PCR. Analisis data menggunakan ANOVA untuk data berdistribusi normal dan Kruskal-Wallis untuk data berdistribusi tidak normal.

Hasil: IC50 calcitriol sebesar 44.87 ppm, IC50 cisplatin sebesar 9.99 ppm dan IC50 kombinasi cisplatin-calcitriol sebesar 36.91 ppm. Tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAPK antara seluruh kelompok ($p=0.08$). Terdapat perbedaan ekspresi mRNA COX-2 antara kelompok cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin-calcitriol ($p=0.005$). Uji post hoc menunjukkan kombinasi cisplatin-calcitriol 36.91 ppm berbeda bermakna ekspresi mRNA COX-2 terhadap kelompok kontrol positif, kelompok calcitriol (4.48, 11.21, 22.43, 44.87 ppm) dan kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol (3.69, 9.22 ppm). Kombinasi cisplatin-calcitriol 18.45 ppm berbeda bermakna ekspresi mRNA COX-2 terhadap kelompok calcitriol (4.48, 11.21, 22.43, 44.87 ppm) dan kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol (3.69, 9.22 ppm). Tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA caspase-1 antara seluruh kelompok ($p=0.604$). Terdapat perbedaan ekspresi mRNA IL-1 β antara seluruh kelompok ($p=0.016$), tetapi perbedaan hanya ditemukan antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif.

Kesimpulan: Terdapat perbedaan ekspresi mRNA COX-2 pada sel CAL27 karsinoma sel skuamosa oral yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol. Kombinasi cisplatin dan calcitriol pada dosis 18.45 dan 36.91 ppm nampak berbeda bermakna ekspresi mRNA COX-2 dibandingkan pemberian cisplatin atau calcitriol secara tunggal. Tidak terdapat perbedaan ekspresi p38 α MAPK, caspase-1 dan IL-1 β pada sel CAL27 karsinoma sel skuamosa oral yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol. Pemberian calcitriol pada sel CAL27 karsinoma sel skuamosa dapat menyebabkan kematian sel melalui jalur inflamasi yang ditandai adanya ekspresi ekspresi p38 α MAPK, COX-2, caspase-1 dan IL-1 β . P38 α MAPK tidak dapat menjadi penanda biologis penentuan kematian sel CAL27 setelah pemberian terapi

calcitriol, namun penanda biologis ini berperan untuk evaluasi efektivitas terapi menggunakan calcitriol dan cisplatin.

Kata kunci: calcitriol, cisplatin, CAL27, p38 α MAPK, COX-2, Caspase-1, IL-1 β

ABSTRACT

Introduction: Cisplatin has antitumor activity against various types of cancers and is the first-choice drug for oral squamous cell carcinoma (OSCC) therapy. The combination of cisplatin and calcitriol (1,25-(OH)₂D₃) has shown positive results in treating this cancer.

Objective: To investigate the differences in mRNA expression of p38 α MAPK, COX-2, caspase-1, and IL-1 β after calcitriol administration to CAL27 oral OSCC cells.

Methods: An experimental laboratory study was conducted at the Central Laboratory of Padjadjaran University from January to May 2023 using CAL27 cells. The cells were divided into calcitriol groups (doses of 4.48, 11.21, 22.43, 44.87 ppm) and cisplatin-calcitriol combination groups (doses of 3.69, 9.22, 18.45, 36.91 ppm). A positive control group received cisplatin, while a negative control group received untreated CAL27 media. All biological markers were tested twice. IC₅₀ was determined using cell viability assays. mRNA expression was evaluated using RT-PCR. Data analysis employed ANOVA for normally distributed data and Kruskal-Wallis for non-normally distributed data.

Results: The IC₅₀ for calcitriol is 44.87 ppm, the IC₅₀ for cisplatin is 9.99 ppm, and the IC₅₀ for the combination of cisplatin-calcitriol is 36.91 ppm. There was no significant difference in p38 α MAPK mRNA expression among all groups ($p=0.08$). However, there was a significant difference in COX-2 mRNA expression among the cisplatin, calcitriol, and cisplatin-calcitriol groups ($p=0.005$). Post hoc analysis revealed that the combination of cisplatin-calcitriol at 36.91 ppm significantly differed in COX-2 mRNA expression from the positive control group, the calcitriol group (4.48, 11.21, 22.43, 44.87 ppm), and the cisplatin-calcitriol group (3.69, 9.22 ppm). The combination of cisplatin-calcitriol at 18.45 ppm significantly differed in COX-2 mRNA expression from the calcitriol group (4.48, 11.21, 22.43, 44.87 ppm) and the cisplatin-calcitriol group (3.69, 9.22 ppm). There was no significant difference in caspase-1 mRNA expression among all groups ($p=0.604$). There was a significant difference in IL-1 β mRNA expression among all groups ($p=0.016$), but the difference was only observed between the negative control and positive control groups.

Conclusion: There is a difference in COX-2 mRNA expression in CAL27 oral squamous cell carcinoma cells treated with calcitriol, cisplatin, and the combination of cisplatin-calcitriol. The combination of cisplatin and calcitriol at doses of 18.45 and 36.91 ppm appears to have a significantly different effect on COX-2 mRNA expression compared to the administration of cisplatin or calcitriol alone. There is no difference in p38 α MAPK, caspase-1, and IL-1 β mRNA expression in CAL27 oral squamous cell carcinoma cells treated with calcitriol, cisplatin, and the combination of cisplatin-calcitriol. Calcitriol administration in CAL27 oral squamous cell carcinoma cells may induce cell death through the inflammatory pathway marked by the expression of p38 α MAPK, COX-2, caspase-1, and IL-1 β . P38 α MAPK may not serve as a biological marker for determining

CAL27 cell death after calcitriol therapy, but it plays a role in evaluating the effectiveness of calcitriol and cisplatin therapy.

Keywords: calcitriol, cisplatin, CAL27, p38 α MAPK, COX-2, Caspase-1, IL-1 β

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian.....	7
1.4. Kegunaan Penelitian.....	8
1.4.1. Kegunaan Teori Ilmiah	8
1.4.2. Kegunaan Praktis	8
BAB II	9
KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN DAN HIPOTESIS	9

2.1. Kajian Pustaka.....	9
2.1.1. Karsinoma sel skuamosa mulut.....	9
2.1.1.1. Epidemiologi.....	9
2.1.1.2. Etiologi dan faktor risiko.....	10
2.1.1.3. Patogenesis.....	11
2.1.1.4. Gambaran klinis	13
2.1.1.5. Diagnosis	13
2.1.1.6. Perawatan.....	16
2.1.2. Jalur persinyalan mRNA p38 α MAPK pada karsinoma sel skuamosa	17
2.1.3. Jalur persinyalan mRNA COX-2 pada karsinoma sel skuamosa	21
2.1.4. Jalur persinyalan mRNA caspase-1 dan IL-1 β pada karsinoma sel skuamosa...	23
2.1.5. Calcitriol	30
2.1.5.1. Metabolisme calcitriol.....	31
2.1.5.2. Peran calcitriol	31
2.1.5.3. Peran calcitriol terhadap kanker	32
2.1.5.4. Peran calcitriol pada jalur persinyalan mRNA p38 α MAPK	34
2.1.5.5. Peran calcitriol pada jalur persinyalan mRNA COX-2.....	35
2.1.5.6. Peran calcitriol pada jalur persinyalan mRNA caspase-1 dan IL-1 β	36
2.2. Kerangka Pemikiran.....	37
2.3. Hipotesis	43

BAB III	44
METODE PENELITIAN.....	44
3.1. Jenis Penelitian.....	44
3.2. Sampel Penelitian.....	44
3.3. Metodologi Penelitian	45
3.4. Variabel Penelitian	45
3.5. Definisi Operasional Variabel	46
3.6. Alat dan Bahan.....	47
3.7. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	49
3.8. Prosedur Penelitian.....	50
3.8.1. Persiapan dan penentuan dosis sampel	50
3.9. Pelaksanaan Penelitian	50
3.10. Bagan alur penelitian.....	58
3.11. Analisis Data	58
3.12. Etik penelitian.....	60
BAB IV	61
HASIL PENELITIAN.....	61
4.1. Hasil Penelitian	61
4.1.1. Penentuan IC50 Calcitriol, Cisplatin dan kombinasi Calcitriol-Cisplatin	61
4.1.2. Perbenihan sel CAL27 pada tiap kelompok perlakuan.....	62

4.1.3.	Ekspresi mRNA p38 α MAP kinase.....	64
4.1.4.	Ekspresi mRNA COX-2	65
4.1.5.	Ekspresi mRNA Caspase-1	67
4.1.6.	Ekspresi mRNA IL-1 β	68
4.2.	Pengujian Hipotesis	70
4.3.	Pembahasan.....	72
4.4.	Keterbatasan Penelitian	79
BAB V		81
SIMPULAN DAN SARAN		81
5.1.	Simpulan	81
5.2.	Saran	82
DAFTAR PUSTAKA		84
DALIL		106
RIWAYAT HIDUP.....		107
LAMPIRAN.....		125

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Model progresitas karsinogenesis oral.	12
Gambar 2. Mekanisme kerja cisplatin.....	17
Gambar 3. Ilustrasi skematik jalur persinyalan MAPK yang mengatur ekspresi protein.	19
Gambar 4. Jalur persinyalan p38 MAPKs.....	20
Gambar 5. Interaksi COX-2 dengan marker lain dalam tumor microenvironment.	22
Gambar 6. Peran cyclooxygenase-2 (COX-2) dalam karsinogenesis leher dan kepala..	23
Gambar 7. Jalur persinyalan caspase.	25
Gambar 8. Proses inflamasi dan pyroptosis.	27
Gambar 9. Pyroptosis pada bakteri dan virus.	29
Gambar 10. Efek pro- dan anti- tumor dari IL-1 β	30
Gambar 11. Calcitriol up-regulate ekspresi p21 dan p27 di fase G1 dan menghambat progresitas siklus sel menuju fase S.....	33
Gambar 12. MKP5 menghambat jalur persinyalan p38 MAPK oleh adanya calcitriol.....	34
Gambar 13. Efek vitamin D terhadap inflamasi.....	35
Gambar 14. Peran caspase-1 dan IL-1-dalam inflamasi.	37
Gambar 15. Alur kerangka pemikiran.....	40
Gambar 16. Kerangka konsep.....	40

Gambar 17. Peralatan yang digunakan dalam penelitian.....	49
Gambar 18. Layout penelitian menggunakan 96 well plate.....	53
Gambar 19. Alur penelitian.....	58
Gambar 20. <i>Inhibitory concentration</i> (IC) 50 dari kelompok cisplatin (A), calcitriol (B) dan kombinasi calcitriol-cisplatin.....	62
Gambar 21. Morfologi pada tiap kelompok perlakuan.....	63
Gambar 22. Grafik ekspresi mRNA dari p38 α MAPK.....	65
Gambar 23. Grafik ekspresi mRNA dari COX-2.....	66
Gambar 24. Grafik ekspresi mRNA dari Caspase-1.....	68
Gambar 25. Grafik ekspresi mRNA dari IL-1 β	69

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Faktor risiko kanker	11
Tabel 2. Kriteria displasia epitel menurut WHO 2017	14
Tabel 3. TNM <i>staging</i>	15
Tabel 4. Klasifikasi caspase.	26
Tabel 5. Definisi operasional variabel.	46
Tabel 6. Reagen untuk RT-PCR.....	55
Tabel 7. Sekuens primer untuk pemeriksaan PCR.....	57
Tabel 8. Konsentrasi dan rerata persentasi cell survival dari kelompok cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin-calcitriol.	61
Tabel 9. Uji ANOVA untuk ekspresi mRNA p38 α MAPK.....	64
Tabel 10. Uji ANOVA untuk ekspresi mRNA COX-2.....	66
Tabel 11. Uji Kruskal-Wallis untuk ekspresi mRNA caspase-1.....	67
Tabel 12. Uji Kruskal-Wallis untuk ekspresi mRNA IL-1 β	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Seminar Usulan Riset	125
Lampiran 2. Permohonan Persetujuan Etik.....	126
Lampiran 3. Persetujuan Komisi Etik FK Universitas Padjadjaran.....	127
Lampiran 4. Hasil viabilitas sel CAL27 dalam menentukan IC50 dari cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin-calcitriol	128
Lampiran 5. Optimasi suhu PCR	129
Lampiran 6. Hasil mRNA ekspresi p38 α MAPK	130
Lampiran 7. Hasil mRNA ekspresi COX-2	131
Lampiran 8. Hasil mRNA ekspresi Caspase-1.....	132
Lampiran 9. Hasil mRNA ekspresi IL-1 β	133
Lampiran 10. Hasil uji normalitas.....	134
Lampiran 11. Hasil ANOVA untuk p38 α MAPK.....	134
Lampiran 12. Hasil ANOVA untuk COX-2	135
Lampiran 13. Hasil Kruskal Wallis untuk caspase-1 dan IL-1 β	135

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang Penelitian

Kanker mulut merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia. Menurut *World Cancer Research Fund International* pada tahun 2020, ditemukan bahwa kanker bibir dan rongga mulut menempati urutan ke 16 dari seluruh kanker dan jumlahnya mencapai 377.700 kasus di dunia.¹ Secara klinis, neoplasma ini paling sering ditemukan pada mukosa lidah (40-50% kasus), sisanya pada mukosa bukal, dasar mulut, gingiva dan palatum.² Berdasarkan usia, sekitar 6% kasus kanker mulut ditemukan pada usia kurang dari 45 tahun.² Pada tahun 2012, berdasarkan data GLOBOCAN, kanker mulut dapat terjadi pada 5.5 laki-laki dan 2.5 perempuan per 100.000 penduduk.³ Tingkat mortalitas akibat kanker mulut diperkirakan mencapai 3-4 laki-laki dan 1.5-2.0 perempuan per 100.000 penduduk.² Prevalensi kanker mulut di Asia, nampak mengalami peningkatan terutama di negara India yang mencapai 60-80% kasus dibandingkan dengan negara lain.⁴ Di Indonesia, penelitian mengenai epidemiologi kanker mulut masih terbatas pada beberapa institusi kesehatan. Menurut Sirait, dari survei RISKESDAS tahun 2007, ditemukan prevalensi sebesar 0.2‰ untuk kanker mulut.⁵ Seiring dengan waktu, jumlah insidensi dan mortalitas akibat kanker mulut juga semakin meningkat, terutama di Asia Tenggara. Data tahun 2012, menunjukkan insidensi kanker berdasarkan *age*

standart rate sebesar 2.3 (laki-laki 2.8 dan perempuan 1.9) dengan tingkat mortalitas sebesar 1.0⁶.

Penyebab kanker mulut masih belum diketahui secara jelas, namun mutasi genetik yang terjadi dapat disebabkan karena kompleksitas berbagai faktor. Disamping faktor genetik yang berperan ⁷, ada faktor lain yang juga dapat menjadi pemicu timbulnya kanker mulut, yaitu merokok, minum alkohol, menyirih, radiasi, kondisi immunosupresi, nutrisi, infeksi kandidiasis, trauma kronis, dan infeksi *Human Papillomavirus* (HPV).^{2,4,8} Diet nutrisi yang mengandung kadar calcitriol (1,25-(OH)2D3) tinggi telah diketahui dapat menurunkan risiko timbulnya kanker mulut pada tikus.⁹ Pada pasien karsinoma sel skuamosa oral, telah ditemukan memiliki kadar rendah calcitriol.⁹ Disamping itu, calcitriol juga direkomendasikan untuk dapat digunakan bersama terapi kanker lainnya baik radiasi, kemoterapi maupun radiokemoterapi.¹⁰ Calcitriol yang merupakan analog vitamin D sintetis, selain memiliki efek terhadap metabolisme kalsium dan fosfor, vitamin ini juga memiliki efek anti tumor, antiproliferatif, apoptosis dan angiogenesis.¹¹

Terapi kombinasi antara calcitriol dengan bahan kemoterapi seperti platinum analog, taxane dan *DNA-intercalating agent* diketahui memberikan efek anti tumor lebih baik daripada bahan kemoterapi itu sendiri.¹² Cisplatin (*cis-diaminedichloroplatinum*, CDDP) merupakan bahan kemoterapi yang memiliki aktivitas antitumor terhadap berbagai jenis kanker dan merupakan obat pilihan pertama untuk terapi karsinoma sel skuamosa (KSS) oral.¹³ Pada tikus model, pemberian cisplatin diketahui dapat mengurangi pertumbuhan tumor dengan cara merusak DNA dan menghambat replikasi DNA sehingga siklus sel menjadi

terhambat dan akhirnya terjadi kematian sel.¹³ Potensi efek anti tumor dari cisplatin akan semakin meningkat dengan pemberian calcitriol.¹⁰

Penelitian mengenai calcitriol telah banyak dilakukan untuk melihat ekspresi dari berbagai penanda biologis pada karsinoma sel skuamosa. Namun, banyak ekspresi gen dalam berbagai jalur persinyalan yang masih belum diketahui secara jelas setelah pemberian calcitriol tersebut. Pada penelitian ini, akan dilakukan penilaian ekspresi gen yang berperan dalam jalur proliferasi dan apoptosis dari sel kultur KSS oral. Dari berbagai macam sel kultur, sel kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah CAL27, merupakan sel kultur KSS oral yang diambil dari ATCC (*American Type Culture Collection*).¹⁴ Jenis tumor ini telah didukung dari data hasil penelitian yang menunjukkan berupa karsinoma sel skuamosa berdiferensiasi baik. Sejak ditemukan pertama kali tahun 1982, sel kultur CAL27 telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian KSS oral baik secara *in vitro* maupun *in vivo* hingga penelitian terbaru pada tahun 2022.^{15–20}

Pada patogenesis tumor, jalur persinyalan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) mengatur berbagai proses seluler, antara lain proliferasi, diferensiasi, angiogenesis, inflamasi, apoptosis dan survival.²¹ Sub jalur persinyalan MAPK terdiri dari *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), p38 dan the ERK5.²² Jalur p38 MAPK terdiri dari beberapa isoform yang memiliki peran masing-masing baik dalam *tumor supressor* (seperti regulasi siklus sel, memicu pro-apoptosis, inhibisi migrasi dan *premature senescence* pada sel primer) maupun *tumor promoting* (regulasi proliferasi, memicu anti-apoptosis, pro-angiogenik, inflamasi dan metastasis). Dari berbagai isoform yang telah

diketahui (α , β , γ , δ), isoform α memiliki peran lebih besar daripada isoform lainnya. Dengan adanya peningkatan ekspresi p38 α MAPK, dapat menyebabkan pembentukan berbagai tipe tumor.²³ Jalur p38 MAPK ini berperan dalam berbagai aktivitas biologik sel tumor dan inhibisi p38 dapat menyebabkan dampak yang tidak diinginkan atau belum diketahui secara jelas. Oleh karena itu p38 MAPK menjadi target farmakologik dalam pengobatan kanker.²³ Berbagai studi sudah menunjukkan ada pengaruh pemberian calcitriol terhadap MAPK, tetapi studi tersebut hanya melihat dari sub jalur MAPK tertentu, terlebih lagi pada kanker organ tubuh lain. Penelitian sub jalur p38 α MAPK ini masih terbatas sehingga belum diketahui secara jelas bagaimana perubahan ekspresi gen tersebut setelah diberikan terapi calcitriol pada sel kultur KSS oral.

Sekitar 15% kanker, didahului adanya proses inflamasi yang ditandai pembentukan ROS (*reactive oxygen species*).²⁴ Selama proses inflamasi, terjadi perubahan hiperkeratosis non-displasia menjadi displasia dan akhirnya terbentuk karsinoma sel skuamosa. Ada beberapa mediator inflamasi yang telah dilaporkan, yaitu sitokin pro inflamasi (IL-1, IL-1R1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β), sitokin imunosupresi (IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ), kemokin (CCL, CXCL1, CXCL2, CCL4, CCL7, CXCL3, CXCL10, CXCL12, CXCR1, CXCR2), faktor transkripsi (AP-1, NF- κ B), enzim (COX-2), dan prostanoid (PGE2).²⁴ COX-2 yang merupakan enzim regulator pembentuk prostaglandin, akan meningkat ekspresinya pada kondisi patologik.²⁵ Kadar COX-2 ini akan meningkat pada KSS oral dan dapat terbentuk akibat aktivasi MAPK dan NF- κ B.^{26,27} Pada tumor lain, diketahui dengan adanya inhibisi COX-2, dapat menyebabkan apoptosis.²⁸ Hingga

sekarang belum ditemukan bagaimana hubungan calcitriol terhadap COX-2 pada KSS oral. Namun beberapa kanker lain, ditemukan adanya hubungan terbalik antara kadar calcitriol dengan COX-2, di dalam semakin progresif keparahan kanker, maka semakin meningkat kadar COX-2.²⁹

Kematian sel yang terprogram tidak akan terjadi pada sel kanker. Apoptosis yang dikendalikan oleh adanya protease caspase menjadi tidak aktif. Caspase-1 yang diketahui memiliki peran dalam inflamasi (yang dapat diaktivasi akibat adanya ROS), juga dapat menyebabkan *pyroptosis* pada kanker prostat, kolorektal dan supresi pertumbuhan sel kultur leukemia.³⁰⁻³² Dengan adanya caspase-1, terjadi maturasi dari pro-IL-1 β dan IL-18.³³ Kedua sitokin ini berperan dalam proses inflamasi. Hingga saat ini, penelitian mengenai caspase-1 dan IL-1 β pada kanker lain sudah pernah dilaporkan³⁴⁻³⁶, tetapi pada KSS oral masih belum ada

Hingga kini, efektivitas pemberian calcitriol pada sel kultur CAL27 masih belum banyak diketahui. Adanya apoptosis sel tumor yang ditandai tes viabilitas sel setelah pemberian calcitriol 500 μ M menunjukkan angka yang cukup rendah yaitu 5.67%, kemudian mengalami penurunan viabilitas sel hingga -4.10% pada konsentrasi sampel 250 μ M (pustaka belum dipublikasikan). Kombinasi antara calcitriol dan cisplatin menunjukkan hasil viabilitas sel yang lebih baik dibandingkan pemberian cisplatin saja. Peran penanda biologis yang berperan dalam jalur proliferasi maupun apoptosis pada KSS oral setelah pemberian calcitriol juga masih sangat jarang, meskipun sudah pernah dilaporkan pada sel HeLa³⁷ dan sel B16-F10¹¹. Pada penelitian ini akan dilakukan penelusuran mengenai penanda biologis p38 α MAP, COX-2, Caspase-1, dan IL-1 β pada sel

kultur karsinoma sel skuamosa oral CAL27 yang diberikan perlakuan calcitriol dan cisplatin serta kombinasi calcitriol-cisplatin. Pemilihan penanda biologis tersebut berdasarkan belum adanya publikasi mengenai jalur persinyalan penanda biologis tersebut dan adanya kaskade pleiotropik dari p38 MAPK yang dapat memicu berbagai jalur kaskade yang berperan dalam proses pertumbuhan atau stres selama karsinogenesis maupun metastasis.²³

Berdasarkan uraian diatas, maka dapat disusun tema sentral penelitian sebagai berikut:

Kanker mulut semakin meningkat kasusnya di dunia. Hingga sekarang penyebab kanker mulut masih belum diketahui secara jelas, mulai dari genetik, hingga faktor lain seperti merokok, minum alkohol, menyirih, radiasi, kondisi immunosupresi, nutrisi, infeksi kandidiasis, trauma kronis, dan infeksi HPV. Diet nutrisi yang mengandung calcitriol diketahui dapat menurunkan risiko kanker mulut pada tikus. Calcitriol ini juga direkomendasikan sebagai terapi adjuvan untuk terapi kanker baik radiasi dan kemoterapi. Bahan ini memiliki efek anti tumor, antiproliferatif, apoptosis dan angiogenesis. Pada patogenesis tumor, jalur persinyalan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) mengatur berbagai proses seluler, antara lain proliferasi, diferensiasi, angiogenesis, inflamasi, apoptosis dan *survival*. p38 MAPK berperan penting dalam jalur apoptosis, di dalam MAPK dan NF- κ B akan mengatur keseimbangan ekspresi COX-2. Inhibisi COX-2 dapat mengakibatkan apoptosis. Melalui jalur MAPK ini, juga terjadi pelepasan ROS yang memicu aktivasi caspase-1 dan IL-1 β . Dengan adanya caspase-1 dan IL-1 β , akan mengaktifkan jalur ekstrinsik apoptosis. Namun hingga sekarang masih belum diketahui secara jelas bagaimana efek calcitriol terhadap penanda biologis p38 α MAP, COX-2, Caspase-1, dan IL-1 β pada karsinoma sel skuamosa. Penelitian ini bertujuan untuk mencari perbedaan ekspresi p38 α MAP, COX-2, Caspase-1, dan IL-1 β serta protein IL-1 β setelah pemberian berbagai dosis calcitriol dan cisplatin serta kombinasi calcitriol-cisplatin pada sel kultur karsinoma sel skuamosa CAL27.

1.2.Rumusan Masalah

- 1.2.1. Apakah terdapat perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAP kinase pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.
- 1.2.2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi mRNA COX-2 pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.
- 1.2.3. Apakah terdapat perbedaan ekspresi mRNA Caspase-1 pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.
- 1.2.4. Apakah terdapat perbedaan ekspresi mRNA IL-1 β pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.

1.3.Tujuan Penelitian

- 1.3.1. Untuk menganalisis perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAP kinase pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.
- 1.3.2. Untuk menganalisis perbedaan ekspresi mRNA COX-2 pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.
- 1.3.3. Untuk menganalisis perbedaan ekspresi mRNA Caspase-1 pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitrol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol.

- 1.3.4. Untuk menganalisis perbedaan ekspresi mRNA IL-1 β pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol.

1.4.Kegunaan Penelitian

1.4.1. Kegunaan Teori Ilmiah

- 1.4.1.1.Membuktikan teori mengenai penanda biologis proliferasi (p38 α MAP) dan inflamasi (COX-2, Caspase-1, dan IL-1 β) pada sel kultur karsinoma sel skuamosa oral yang diberikan terapi menggunakan calcitriol..
- 1.4.1.2.Mengembangkan teori mengenai dampak pemberian calcitriol terhadap patogenesis jalur persinyalan dari p38 α MAPK, COX-2, Caspase-1, dan IL-1 β pada sel kultur karsinoma sel skuamosa oral.

1.4.2. Kegunaan Praktis

Memberikan informasi kepada para klinisi mengenai efikasi terapi calcitriol terhadap penanda biologis (*predictive*) tertentu yang dapat menjadi acuan penyembuhan (*prognostic*) karsinoma sel skuamosa oral yang diberikan terapi tambahan (*adjuvan*) calcitriol. Fokus riset penelitian ini yang berbasis ilmu kedokteran dasar biologi molekular diharapkan dapat berdampak terhadap penggunaan pengobatan secara klinis.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN DAN HIPOTESIS

2.1. Kajian Pustaka

2.1.1. Karsinoma sel skuamosa mulut

Karsinoma sel skuamosa merupakan neoplasma yang paling sering ditemukan dalam rongga mulut. Tumor ini paling sering ditemukan dalam rongga mulut dibandingkan kanker mulut lainnya, dengan perkiraan sebanyak 80-90% dari seluruh neoplasma malignan.^{38,39}

2.1.1.1. Epidemiologi

Meskipun insidensi kanker mulut di dunia bervariasi, namun dalam laporannya, Johnson dkk menyatakan bahwa predileksi rongga mulut menjadi urutan ke 6 sampai 9 untuk KSS oral.³⁹ Data dari *World Cancer Research Fund International* tahun 2020, ditemukan bahwa kanker bibir dan rongga mulut menempati urutan ke 16 dari seluruh kanker dan jumlahnya mencapai 377.700 kasus di dunia.¹ Usia penderita kanker bervariasi, namun 6% kasus ditemukan pada usia kurang dari 45 tahun.² Berdasarkan GLOBOCAN 2012, kanker mulut dapat terjadi pada 5.5 laki-laki dan 2.5 perempuan per 100.000 penduduk.³ Tingkat mortalitas akibat kanker mulut diperkirakan mencapai 3-4 laki-laki dan 1.5-2.0 perempuan per 100.000 penduduk.²

Prevalensi kanker mulut di Asia, nampak mengalami peningkatan terutama di negara India yang mencapai 60-80% kasus dibandingkan dengan negara lain.⁴ Di Indonesia, menurut Sirait, dari survei RISKESDAS 2007, ditemukan prevalensi sebesar 0.2‰ untuk kanker mulut.⁵ Seiring dengan waktu, jumlah insidensi dan mortalitas akibat kanker mulut juga semakin meningkat, terutama di Asia Tenggara.

2.1.1.2. Etiologi dan faktor risiko

Penyebab kanker mulut masih belum diketahui secara jelas, namun mutasi genetik selalu terjadi sebelum terjadi perubahan sel menjadi neoplasma. Kebiasaan merokok, minum alkohol, menyirih dan radiasi sinar ultraviolet (khususnya untuk kanker bibir) merupakan faktor prediposisi terbanyak dari KSS oral. Faktor prediposisi lainnya adalah infeksi HPV, infeksi Candida, defisiensi nutrisi, genetik.^{2,4,8,39} Lesi *oral potentially malignant disorder* (OPMD) juga merupakan salah satu faktor prediposisi yang dapat berkembang menjadi keganasan.^{40,41} Lesi OPMD antara lain lesi prekanker (leukoplakia, eritroplakia, lesi palatal pada perokok terbalik) dan kondisi prekanker (*oral submucosis fibrosis*, liken planus oral, aktinik keratosis, lupus eritematus diskoid).⁴¹

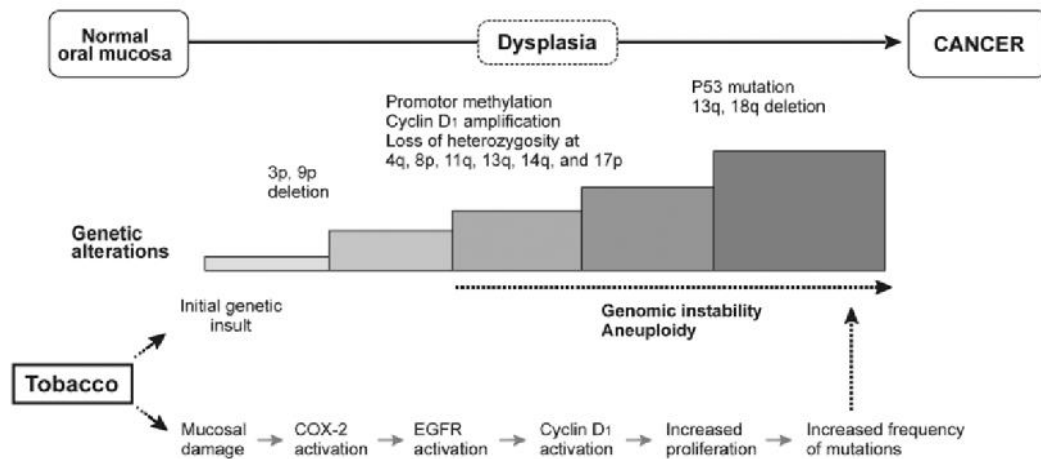
Menurut Wu dkk⁴², faktor prediposisi dari karsinoma sel skuamosa dapat dibagi menjadi faktor intrinsik dan non-intrinsik. Faktor intrinsik dipengaruhi oleh adanya kesalahan replikasi DNA yang terjadi secara random. Sedangkan faktor non-intrinsik dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Faktor risiko kanker⁴²

Faktor risiko endogenus	Faktor risiko eksogenus
- Penuaan biologis	- Radiasi
- Kecenderungan genetik	- Karsinogen kimiawi
- Gangguan perbaikan DNA	- Tumor yang dipicu oleh adanya infeksi virus
- Hormon	- Gaya hidup yang buruk, seperti merokok, kurang berolah raga, imbalance nutrisi
- Faktor pertumbuhan	
- Peradangan	

2.1.1.3. Patogenesis

KSS oral timbul sebagai kejadian molekuler multipel yang didasari adanya respon terhadap faktor predisposisi dan karsinogen. Paparan kronis karsinogen seperti tembakau, alkohol, virus onkogenik dan inflamasi dapat menyebabkan kerusakan gen. Akumulasi gangguan genetik (aktivasi mutasi, amplifikasi onkogen sehingga memicu sel tumor menjadi berproliferasi dan *survival*, inaktivasi gen *tumor supresor*) ini juga dapat menyebabkan pertumbuhan lesi premalignan yang selanjutnya menuju keganasan. Sel tumor akan menghindari apoptosis dan terus mengalami proliferasi melalui perpanjangan telomer kromosom. Disamping itu, sel tumor mampu menginduksi proliferasi sel endotel untuk membuat pembuluh darah baru. Dengan adanya pembuluh darah baru, akan menyebabkan invasi tumor semakin luas dan metastasis.



Gambar 1. Model progresitas karsinogenesis oral. Perubahan dari epitel normal akibat berbagai gangguan genetik menuju displasia dan karsinoma invasif. Perubahan genetik ini antara lain aktivasi *epidermal growth factor receptor* (EGFR), gangguan gen tumor supresor p53 dan p16 serta overekspresi *cyclin D1*.^{43,44}

Paparan kronis dari karsinogen seperti tembakau, alkohol, virus onkogen dan inflamasi, dapat menyebabkan kerusakan gen (Gambar 1). Adanya akumulasi perubahan genetik yang terus menerus termasuk mutasi gen atau amplifikasi onkogen (yang memicu *survival* dan proliferasi sel, inaktivasi gen tumor supresor), akan menyebabkan timbulnya lesi premalignan dan berakhir pada karsinoma invasif. Sel tumor akan memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan mampu menghindari signal penghambat pertumbuhan seperti apoptosis dan tetap memperpanjang telomer kromosom. Dengan pertumbuhan yang berlanjut, KSS akan membentuk pembuluh darah baru (proses angiogenesis) sehingga menyebabkan invasi tumor semakin dalam dan terjadi metastasis. Pada sel kanker, molekul adhesi sel (seperti *cadherin* dan *integrin*) menjadi hilang, sehingga memudahkan sel tumor bermetastasis.

2.1.1.4. Gambaran klinis

Umumnya lesi KSS diawali dengan adanya gambaran lesi OPMD.^{45,46} Lesi OPMD dapat berupa eritroplakia, leukoplakia, liken planus, submukosis fibrosis, lupus eritematosus diskoid, diskeratosis kongenita, dan sindrom Plummer-Vinson.

Gambaran klinis KSS oral biasanya ditemukan berupa lesi endofitik (ulserasi, erosi), namun dapat pula berupa lesi eksofitik (nodul). Pada lesi ulseratif, umum disertai adanya daerah tengah lesi yang mengalami nekrosis dan dikelilingi tepi yang lebih tinggi dan bergulung.^{38,39} Pada stadium yang telah lanjut, ditandai juga adanya limfadenopati regional, biasanya pada daerah servikal.

Gejala klinis yang menyertai berupa adanya rasa sakit yang ringan pada stadium awal, kadang disertai adanya massa yang akan mengganggu mobilitas organ. Seiring dengan waktu, invasi tumor akan semakin luas, sehingga mobilitas organ semakin menurun sehingga berdampak terhadap asupan nutrisi dan fungsi bicara dan menelan bahkan kesulitan bernapas.⁴⁵ Pada stadium lanjut, secara ekstraoral dapat nampak berupa pembengkakan secara unilateral.

2.1.1.5. Diagnosis

Diagnosis KSS hanya dapat ditegakkan berdasarkan hasil dari pemeriksaan histopatologi yang menunjukkan adanya displasia sel. Disamping itu berdasarkan klasifikasi dari WHO tahun 2017, terdapat iregular stratifikasi epitel, kehilangan polaritas sel basal, rete pegs, peningkatan sel yang mengalami mitosis, mitosis abnormal, diskeratosis, mutiara keratin dalam rete pegs dan hilangnya kohesi sel epitel.⁴⁷

Dalam diagnosis KSS, juga disertai adanya penentuan sistem *staging* baik secara histopatologi maupun secara klinis. Secara histopatologi, *staging* dapat dilihat pada tabel 2. Secara klinis, penentuan *staging* dari KSS ditentukan oleh *staging* TNM (ukuran tumor/T, lymph node/N, metastasis/M). Berdasarkan *American Joint Committee for Cancer Staging*, KSS oral memiliki kelompok *staging* yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kriteria displasia epitel menurut WHO 2017⁴⁷

Perubahan Struktural	Perubahan Selular
Stratifikasi epitel iregular	<i>Anisonucleosis</i>
Hilangnya polaritas sel basal	Pleiomorfisme nukleus
<i>Rete ridge</i> yang berbentuk <i>drop-shaped</i>	<i>Anisocytosis</i>
Peningkatan jumlah mitosis	Pleiomorfisme selular
Mitosis superfisial abnormal	Peningkatan rasio nukleus-sitoplasma
Diskeratosi	Gambaran mitotik atipia
Ditemukan <i>keratin pearls</i> dalam <i>rete ridge</i>	Peningkatan jumlah dan ukuran <i>nucleoli</i>
Hilangnya kohesi antar sel epitel**	<i>Hyperchromasia</i>

Tabel 3. TNM staging⁴⁸

Tumor primer (T)	
T1	Tumor berukuran <2 cm
T2	Tumor berukuran 2-4 cm
T3	Tumor berukuran >4 cm
T4	Tumor menginvasi struktur didekatnya
Metastasis kelenjar limfe (N)	
N0	Tidak ada metastasis kelenjar limfe regional
N1	Metastasis pada sebuah nodus kelenjar limfe ipsilateral. Berukuran <3 cm
N2a	Metastasis pada sebuah nodus kelenjar limfe ipsilateral. Berukuran 3-6 cm
N2b	Metastasis pada multipel nodus kelenjar limfe ipsilateral. Berukuran <6 cm
N2c	Metastasis pada bilateral nodus kelenjar limfe. Berukuran <6 cm
N3	Metastasis pada nodus kelenjar limfe berukuran <6 cm
Metastasis jauh (M)	
M0	Tidak ditemukan metastasis jauh
M1	Ada metastasis jauh
Kelompok <i>staging</i>	
<i>Stage 1</i>	T1 N0 M0
<i>Stage 2</i>	T2 N0 M0
<i>Stage 3</i>	T3 N0 M0 atau T1/T2/T3 N1 M0
<i>Stage 4</i>	Seluruh T4. Seluruh N2 atau N3. Seluruh M1

2.1.1.6. Perawatan

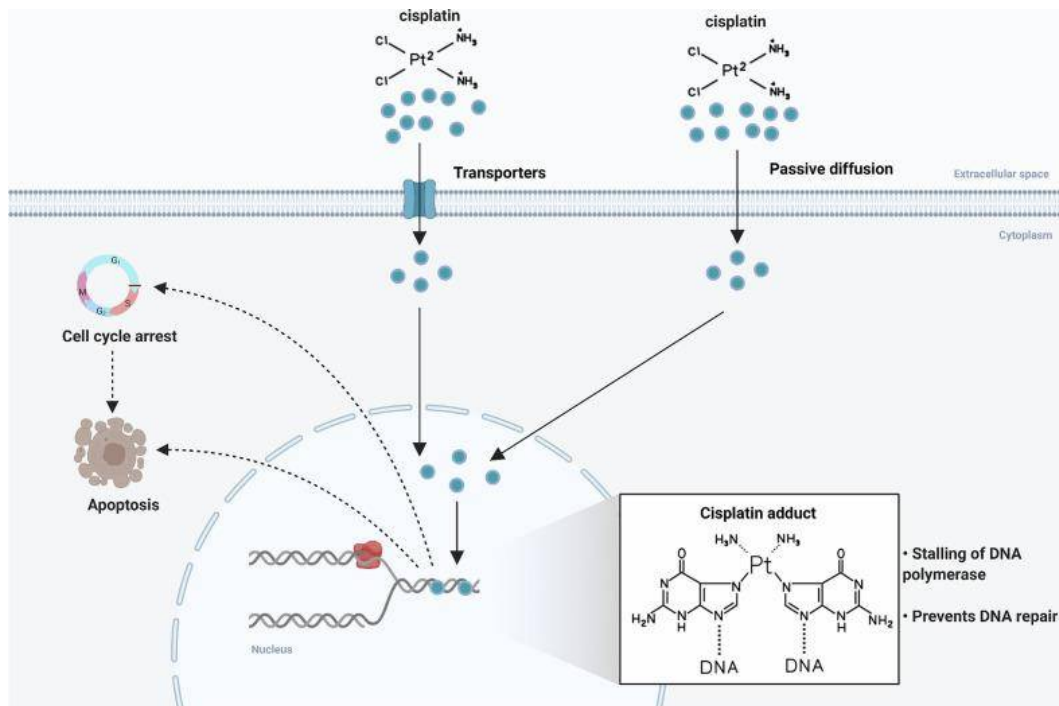
Pemeriksaan histopatologi KSS sangat penting untuk menentukan tatalaksana keganasan ini. Perawatan biasanya tidak dapat dilakukan pada terapi tunggal, melainkan multiterapi. Terapi ini antara lain pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi.

1. Pembedahan.

Pembedahan merupakan pengobatan lini pertama untuk lesi yang berukuran kecil dan predileksi tempatnya mudah diakses. Reseksi bedah KSS oral dilakukan hingga tepi bebas tumor melebihi 5 mm memberikan prognosis yang lebih baik.⁴⁹ Namun perlu diperhatikan bahwa *tumor cancerization field* tidak hanya terbatas pada tumor primer, tetapi dapat pula terjadi pada mukosa lain didekatnya, sehingga kombinasi dengan kemoterapi atau radiasi mungkin diperlukan.

2. Kemoterapi

Kemoterapi merupakan terapi kanker yang umum dilakukan, dan seringkali dikombinasikan dengan radioterapi dan pembedahan. Kemoterapi berdampak terhadap DNA dengan menghambat pembelahan sel untuk meningkatkan apoptosis sel (Gambar 2). FDA (*Food and Drug Administration*) merekomendasikan beberapa sitostatika untuk digunakan sebagai terapi malignansi di daerah kepala dan leher, antara lain *paclitaxel*, *carboplatin*, *5-fluororacil*, *doxorubicin*, dan *cisplatin*.⁵⁰



Gambar 2. Mekanisme kerja cisplatin. Setelah masuk dalam sel tumor melalui transport aktif atau difusi pasif, maka cisplatin akan berikatan dengan DNA dalam nukleus, sehingga mengganggu siklus sel dan menyebabkan apoptosis sel.¹³

3. Radioterapi

Radioterapi dapat menjadi pilihan terapi yang efektif untuk mencapai kontrol lokal tumor bagi pasien post-reseksi, kemoterapi, ataupun pasien dengan multipel tumor.^{51,52}

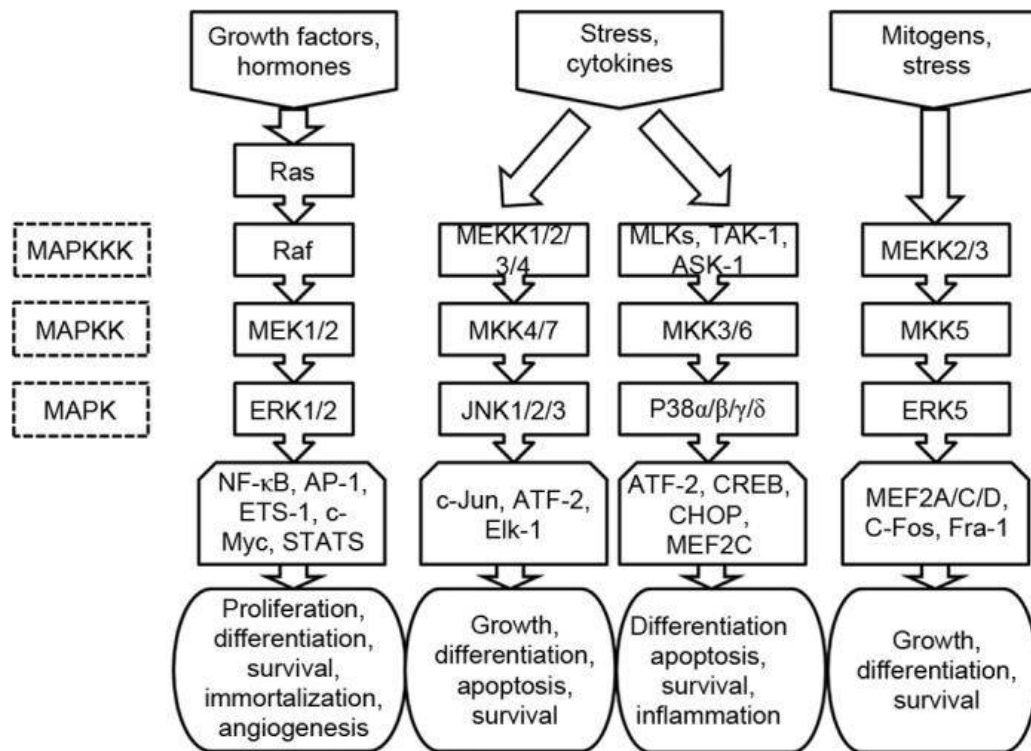
2.1.2. Jalur persinyalan mRNA p38 α MAPK pada karsinoma sel skuamosa

Jalur persinyalan MAPK terdiri dari 4 sub jalur, yaitu *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK1, JNK2, JNK3), p38 dan ERK5.²² Sub jalur persinyalan ini melibatkan berbagai protein sebagai signal ekstraselular terhadap nukleus, mengatur ekspresi gen yang dihasilkan.⁵³ Tahapan

signal ini terdiri dari MAPK kinase kinase (MAPKKK), MAPK kinase (MAPKK) dan MAPK⁵⁴ yang akan berdampak pada proliferasi, diferensiasi dan survival sel tumor.^{55,56} Gambar 3 menunjukkan patogenesis tumor melalui jalur persinyalan MAPK yang mengatur berbagai proses seluler, antara lain proliferasi, diferensiasi, angiogenesis, inflamasi, apoptosis dan *survival*.²¹

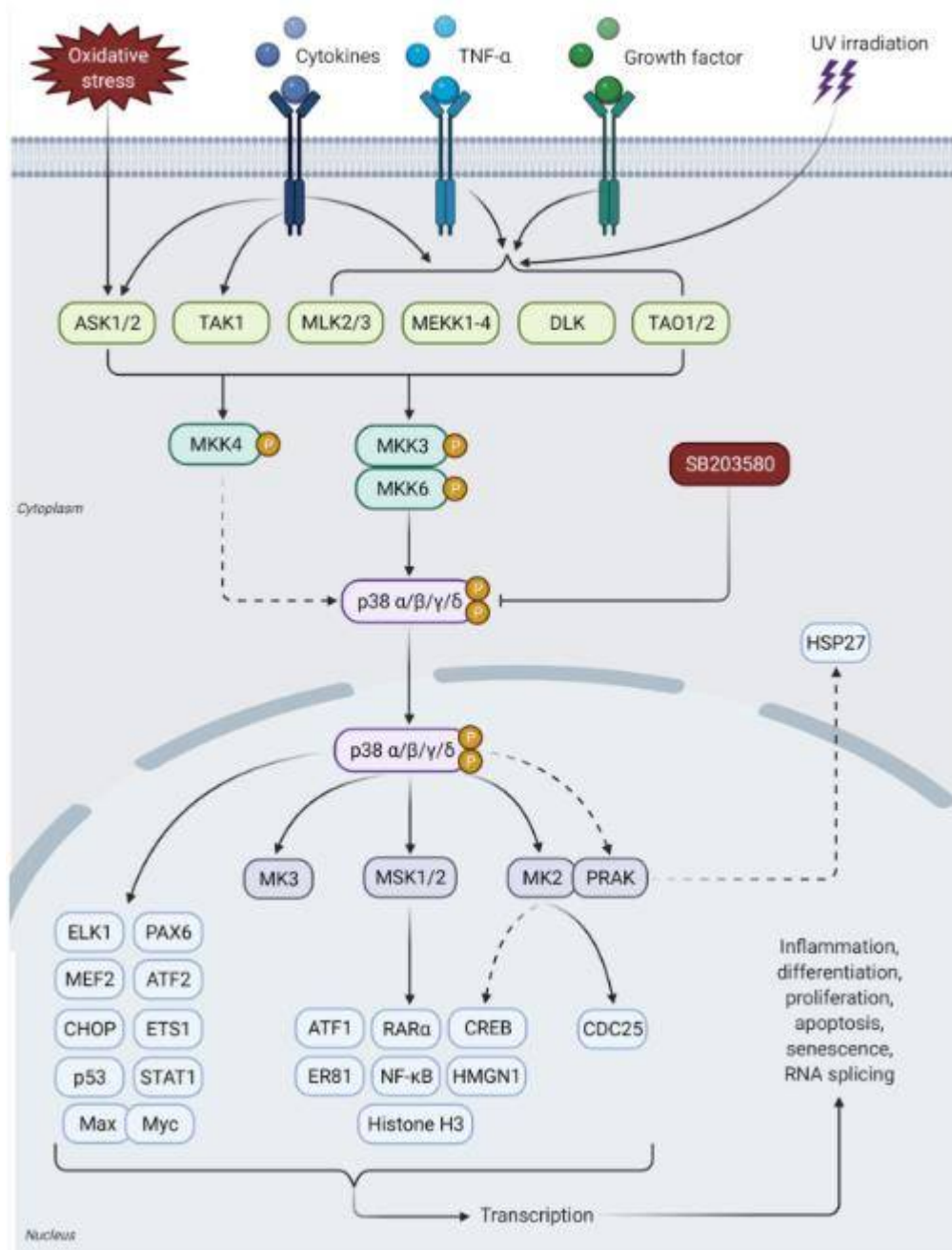
Ekspresi protein yang meningkat dalam jalur persinyalan MAPK, akan meningkatkan pertumbuhan kanker mulut.⁵⁷ Aktivasi MAPK dapat menyebabkan perubahan sel normal menjadi fenotipe tumor. Oleh karena itu, penghambatan jalur persinyalan ini akan mengubah kembali sel tumor menjadi sel normal secara *in vitro*, yang akhirnya akan menghambat pertumbuhan tumor.⁵⁸

Sebanyak 4 *isoform* p38 MAPK telah dilaporkan, yaitu α , β , γ , dan δ (Gambar 4). p38 α dan p38 β memiliki fungsi yang sama, sedangkan p38 γ dan p38 δ memiliki struktur yang hampir sama satu dengan lainnya.^{59,60} p38 α dan p38 δ banyak diekspresikan pada lapisan epidermis, sedangkan p38 β atau p38 γ tidak dapat terdeteksi pada epidermis normal.^{61,62}



Gambar 3. Ilustrasi skematik jalur persinyalan MAPK yang mengatur ekspresi protein.²¹

p38 α memiliki peran penting dalam *cell-cycle arrest* dan apoptosis.⁶³ Peran p38 α dalam kanker masih diperdebatkan, terutama antiproliferatif dan *survival*.^{64–67} p38 α dapat meregulasi progresi siklus sel secara negatif pada G1/S dan G2/M transitions, melalui *downregulation cyclin* dan *upregulation cyclin-dependent kinase inhibitors*.^{66,67} Sebaliknya, pro-*survival* p38 α nampak pada respon kerusakan DNA G2, melalui *upregulation Bcl2 family proteins*⁶⁴, atau melalui induksi *cancer dormancy*. Oleh karena peran p38 α tersebut, hal ini menjadi mekanisme penting mengapa terjadi resistensi obat oleh sel kanker.⁶⁵ Efek yang berlawanan dari p38 α juga ditemukan pada karsinogenesis kulit. p38 α akan mengaktifkan p53 tumor supresor dan jalur p53 akan mengaktifkan p38 MAPK untuk sel *survival*.^{68,69}



Gambar 4. Jalur persinyalan p38 MAPKs. Empat tipe isoform p38 MAPK (α , β , γ , dan δ) yang dapat diaktivasi oleh adanya stres eksternal, sitokin inflamasi atau radiasi UV. Setelah teraktivasi, jalur ini akan menyebabkan produksi faktor pro-apoptosis untuk inflamasi, diferensiasi, proliferasi, apoptosis, *senescence*, dan *RNA splicing*.⁷⁰

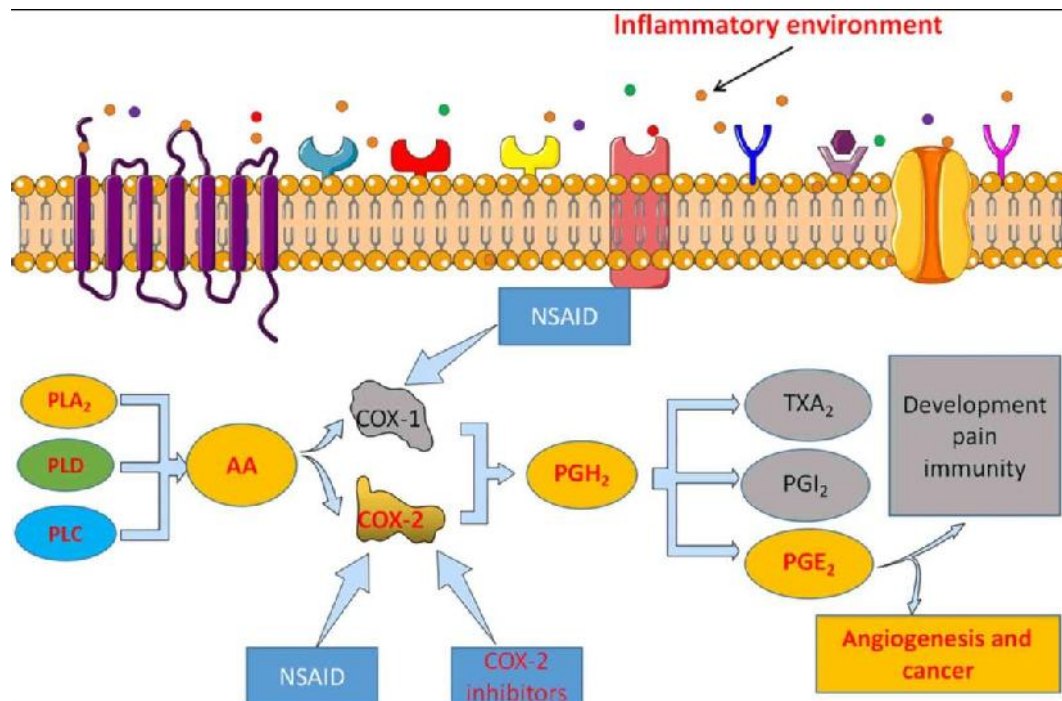
Secara normal di kulit, gambaran imunohistokimia menunjukkan bahwa p38 α ditemukan di lapisan basal dan suprabasal dari epidermis normal, namun pada KSS kulit, p38 α berkurang jumlahnya.⁷¹ Dengan adanya penghambatan p38 α MAPK, maka akan meningkatkan proliferasi sel KSS A431.⁷¹

2.1.3. Jalur persinyalan mRNA COX-2 pada karsinoma sel skuamosa

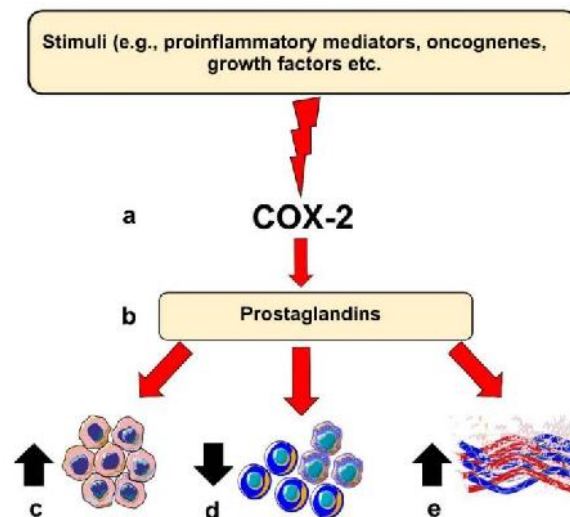
Cyclooxygenase merupakan enzim regulator yang berperan dalam merubah *arachidonic acid* menjadi prostaglandin. Mekanismenya dengan penambahan oksigen pada *arachidonic acid* sehingga terbentuk prostaglandin G2 (PGG2). Kemudian PGG2 akan mengalami perubahan menjadi prostaglandin H2 (PGH2) yang selanjutnya akan mengalami perubahan menjadi prostanoid seperti prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin D2, *prostacyclin* or *thromboxane A2* ⁷².

Ada dua bentuk *isoform* yaitu COX-1 dan COX-2 (Gambar 5). COX-1 yang dapat ditemukan pada berbagai sel, berperan dalam sintesis prostaglandin untuk homeostasis jaringan (baik agregasi platelet dan sekresi mukus pada lapisan dinding saluran pencernaan), sedangkan COX-2 yang sedikit jumlahnya dan seringkali ditemukan di saluran pencernaan, ginjal, sistem saraf pusat dan traktus reproduksi perempuan. COX-2 ini berperan juga dalam sintesis prostaglandin, tetapi khusus untuk kondisi patologik²⁵ dan pembentukannya dipicu melalui adanya faktor pertumbuhan, sitokin, karsinogen dan onkogen serta inflamasi kronis ⁷³. Pada penelitian Cho dkk, ditemukan bahwa pasien KSS oral memiliki ekspresi tinggi dari COX-2 dibandingkan mukosa normal.^{26,74} Oleh karena itu, beberapa penelitian dilakukan untuk membuktikan apakah dengan menghambat COX-2 dapat menjadi

salah satu terapi dari kanker. Pemberian inhibitor COX-2 (*non steroid antiinflammatory drug*), berhubungan dengan overekspresi dari gen p53 pada sel kultur KSS oral.^{28,75}



Gambar 5. Interaksi COX-2 dengan marker lain dalam tumor *microenvironment*. Ekstraselular *environment* yang mengalami paparan inflamasi, menyebabkan COX-2 menjadi meningkat dalam sitoplasma dari berbagai jenis sel dan memicu perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin dan thromboxanes. PL, fosfolipase; AA, asam arakidonat; COX, siklooksigenase; NSAID, *non-steroidal anti-inflammatory drugs*; PG, prostaglandin; TXA, tromboxan.⁷⁶



Gambar 6. Peran *cyclooxygenase-2* (COX-2) dalam karsinogenesis leher dan kepala⁷⁷. (a) stimulus inflamasi, onkogen atau faktor lain yang memicu ekspresi COX-2 dalam sel epitel; (b) hal ini menyebabkan produksi prostaglandin yang dapat mempengaruhi berbagai proses protumorigenik, seperti (c) peningkatan respon anti-apoptosis, (d) supresi respon sel imun, atau (e) memicu angiogenesis dalam jaringan host.

Menurut Cho dkk, overekspresi COX-2 akan merubah adhesi sel, menghambat apoptosis dan mengganggu signal regulator pertumbuhan.²⁶ Gambar 6 menunjukkan skematik peran COX-2 dalam karsinogenesis. Pada penelitian Cho dkk, ditemukan bahwa COX-2 yang dihambat menggunakan *sulforaphane*, akan menyebabkan apoptosis akibat aktivasi caspase pada sel tumor kultur KSS.²⁶

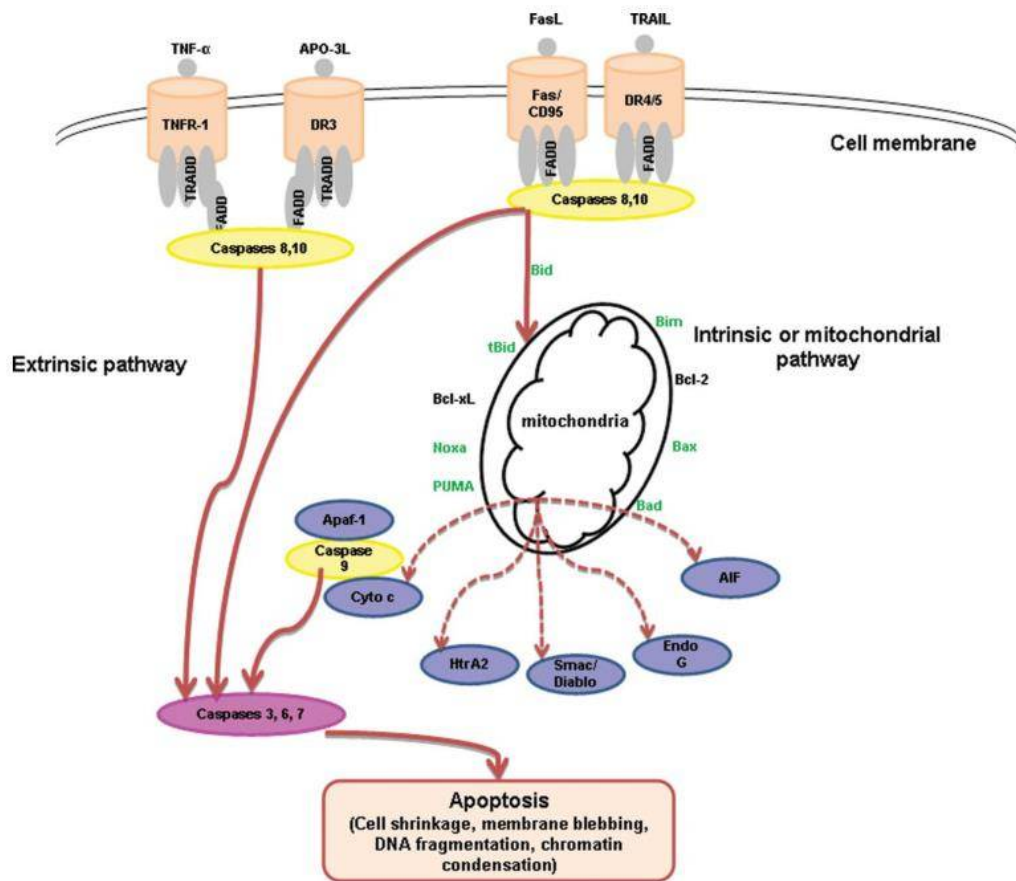
2.1.4. Jalur persinyalan mRNA caspase-1 dan IL-1 β pada karsinoma sel skuamosa

Salah satu proses paling penting dalam kematian sel adalah apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram dan menjadi elemen esensial dalam patogenesis berbagai penyakit. Kondisi apoptosis yang berlebihan dapat ditemukan

pada penyakit degeneratif sedangkan apoptosis yang sangat rendah terjadi pada kanker. Gambar 7 menunjukkan jalur persinyalan caspase.

Proses apoptosis dapat dibagi menjadi 3 kategori, yaitu aktivasi caspase, DNA dan protein *breakdown*, perubahan membran sel dan pengenalan oleh sel fagosit. Pada awalnya, apoptosis dapat dibagi menjadi (a) jalur ekstrinsik/*death receptor* (DR3) *mediated*; (b) jalur intrinsik (Gambar 5). Disamping kedua jalur tersebut, apoptosis dapat terjadi pada jalur lain yaitu saat sel limfosit T sitotoksik melakukan fagositosis sel atau melalui *granzyme-perforin mediated pathway/novel pathway*.

Caspase merupakan protease yang disintesis sebagai *zymogen*. *Human caspase family* terdiri dari 12 member (Caspase-1 sampai 10, Caspase-12 dan Caspase-14) yang dikelompokkan menjadi fungsi utamanya, yaitu inflamasi, apoptosis dan diferensiasi (Tabel 4).⁷⁸ Caspase inflamasi terdiri dari Caspase-1, -4, -5 (Caspase-11 pada tikus) dan -12.⁷⁹⁻⁸¹ Caspase apoptosis berperan dalam jalur intrinsik (*mitochondria dependent*) maupun ekstrinsik (melalui induksi *death receptor* seperti Fas atau Trail).⁸² Beberapa caspase berperan untuk mengawali kaskade signal apoptosis (Caspase-2, -9, -8, -10), sedangkan lainnya berperan *cleavage of substrate* yang memicu proses apoptosis (Caspase-3, -6, -7). Caspase-14 akan teraktivasi selama diferensiasi terminal keratinosit dan melindungi kulit terhadap radiasi ultraviolet B.⁸³



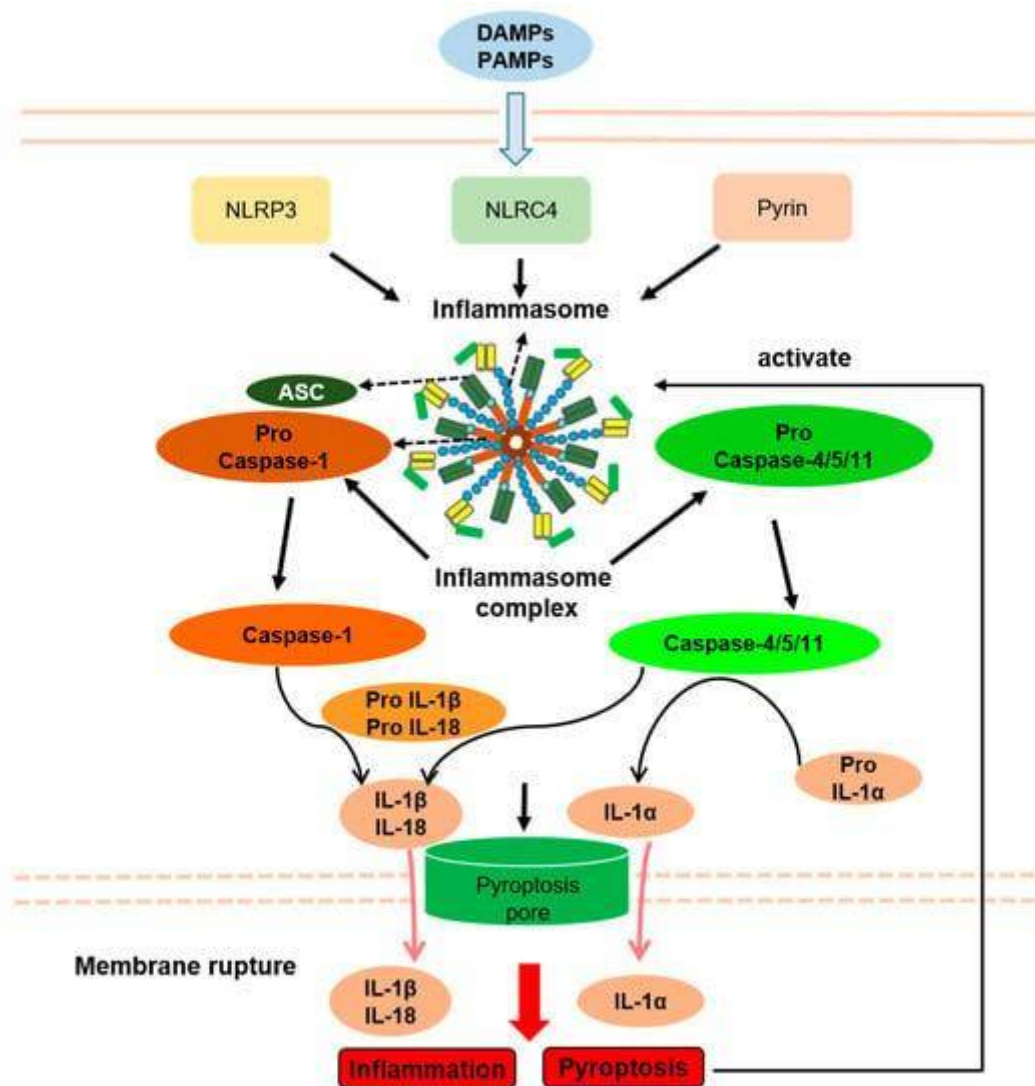
Gambar 7. Jalur persinyalan caspase.⁸⁴

Caspase-1 disintesis sebagai enzim pro-caspase-1 inaktif dan dilepaskan secara fisiologis menjadi caspase-1 aktif setelah adanya stimulus inflamasi. Setelah teraktivasi, caspase-1 akan menghasilkan sitokin pro inflamasi seperti IL-1 β , IL-18 dan IL-33. Stimulasi TLR receptor akan mengaktifkan jalur NF- κ B dan memicu sintesis pro-IL-1 β , sehingga mengawali proses inflamasi.⁷⁸

Tabel 4. Klasifikasi caspase^{33,78}.

Klasifikasi fungsi		Member	Spesies
Caspase inflamasi		Caspase-1	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-4	<i>Human</i>
		Caspase-5	<i>Human</i>
		Caspase-11	Tikus
		Caspase-12-S	Tikus
		Caspase-12-L	<i>Human</i>
Caspase apoptosis	Inisiator	Caspase-2	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-9	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-8	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-10	<i>Human</i>
	Efektor	Caspase-3	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-6	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-7	Tikus, <i>human</i>
Diferensiasi		Caspase-13	<i>Bovine</i>
		Caspase-14	Tikus, <i>human</i>
		Caspase-16	Tikus, <i>human</i>

Hingga sekarang, penelitian caspase-1 banyak telah dilaporkan, namun perannya dalam KSS oral masih terbatas. Peran Caspase-1 juga masih diperdebatkan karena deregulasi caspase-1 dapat menimbulkan efek positif maupun negatif. Pada tikus model penyakit Huntington, menyebabkan penurunan progresitas penyakit dan mortalitas.⁸⁵ Pada sklerosis amiotrofik lateral menyebabkan efek protektif terhadap penyakit.⁸⁶ Pada kanker kolon, terjadi peningkatan ukuran tumor melalui proliferasi sel.³² Pada leukemia, terjadi supresi pertumbuhan sel kultur leukemia.³⁰ Pada karsinoma hepatoselular, menyebabkan metastasis dan invasi dari karsinoma.⁸⁷ Pada kanker prostat, menyebabkan induksi apoptosis.³¹

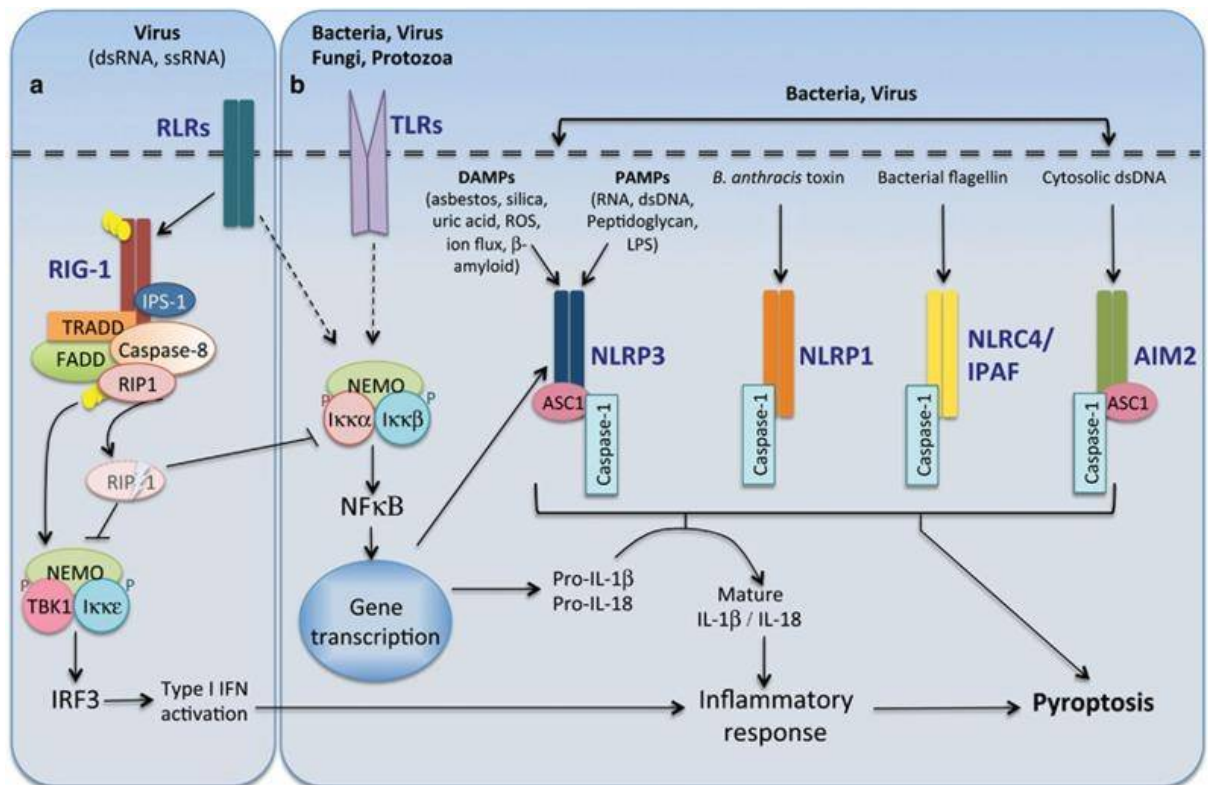


Gambar 8. Proses inflamasi dan *pyroptosis*.⁸⁸ PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*; DAMPs, *danger-associated molecular patterns*; NLRP3, *NLR pyrin domain containing 3*; NLRC4, *NLR containing a caspase recruitment domain 4*; ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*;

Efek antitumor caspase-1 melalui induksi apoptosis pada sel kultur kanker prostat LNCaP setelah diberikan TGF- β ; atau pada sel kultur kanker prostat DU-145 setelah dilakukan iradiasi. Caspase-1 juga memiliki efek tumor supresor pada kanker kolorektal, sehingga menginduksi apoptosis melalui p53.³² Kematian sel yang umumnya dikenal sebagai apoptosis, namun pada kematian sel yang

disebabkan karena Caspase-1 disebut sebagai *pyroptosis*.⁸⁹ Caspase-1 menginduksi kematian sel melalui proses proteolisis dari protein Gasdermin D, yang akan membentuk porus pada membran plasma sehingga integritas selular terganggu dan akhirnya *pyroptosis*. Porus Gasdermin ini juga menyebabkan pelepasan IL-1 β . (Gambar 8)

IL-1 β berperan dalam induksi demam dan berbagai kelainan pro-inflamasi. Tidak seperti kelas IL-1 lainnya, IL-1 β dan IL-18 disintesis sebagai prekursor tanpa adanya signal sintesis dalam retikulum endoplasmik/jalur Golgi.⁹⁰ Dalam sitosol, pro-IL-1 β dan pro-IL-18 mengalami maturasi karena caspase-1.⁷⁸ Pada penelitian *in vitro*, ditemukan bahwa sel dinding fungal pada kultur sel KSS oral, menghasilkan sitokin proinflamasi IL-1 β melalui jalur NLRP3/IL-1 β (Gambar 9). Hal ini menunjukkan bahwa KSS oral dapat menghasilkan sitokin IL-1 β dan dipengaruhi adanya mikrobiota atau komponen sel mikrobiota itu sendiri; jadi kemungkinan ada interaksi kompleks antara sel kanker, sel imun dan mikrobiota dalam tumor *microenviroment*.⁹¹

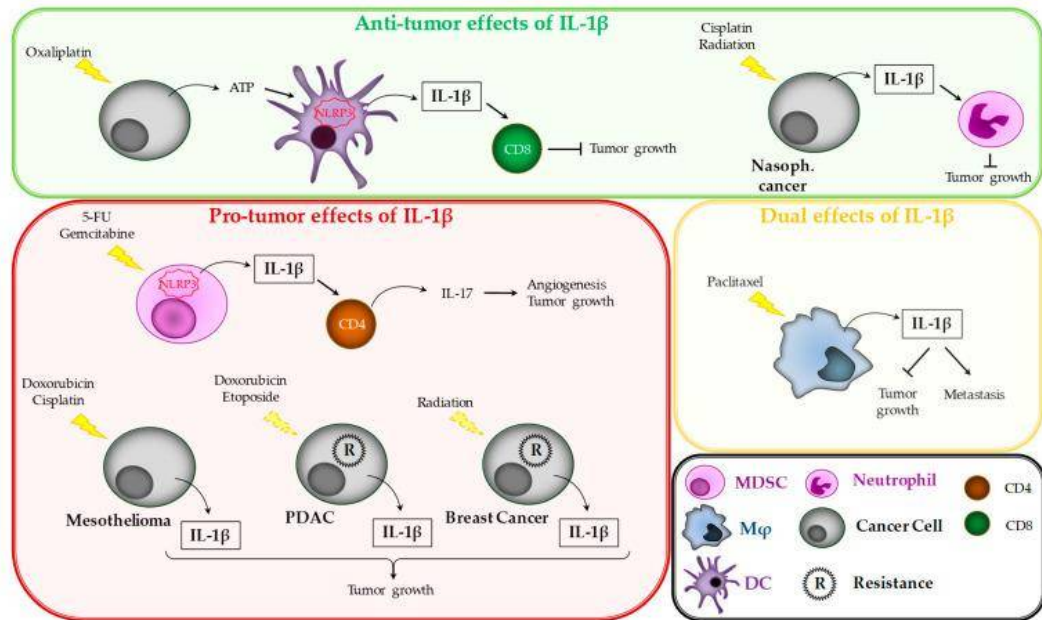


Gambar 9. *Pyroptosis* pada bakteri dan virus³³. (a) Caspase-8 menghambat signal RIG-1. Aktivasi *retinoic-acid-like receptors* (RLRs) sangat penting untuk imunitas antivirus. Setelah infeksi virus, kompleks caspase-8 DISC (terdiri dari FADD, TRADD dan *ubiquitin-conjugated* RIP1 (Ub-RIP1)), bergabung membentuk RIG-1 complex. RIP-1 akan menghambat IRF3 dan NF-κB sehingga menurunkan IFN dan IL-1β-/IL-18 yang memulai proses inflamasi. (b) Pembentukan kompleks inflamasi dipicu oleh adanya *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) atau oleh adanya *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Aktivasi *Toll-like receptors* (TLRs) setelah paparan patogen, akan menginduksi NF-κB untuk transkripsi IL-1β, IL-18 dan NLRP3. Aktivasi Caspase-1 dimediasi melalui adanya berbagai kompleks inflammasom (NLRP3, NLRP1, NLRC4 dan AIM2). Aktivasi caspase-1 juga membantu melepaskan dan mematurasi pro-IL-1β dan IL-18. Setelah infeksi akut dan respon inflamasi akut, maka caspase-1 akan memicu kematian sel melalui *pyroptosis*.

Eksresi IL-1β saliva juga ditemukan meningkat secara bermakna pada pasien KSS oral dibandingkan kelompok kontrol.⁹² IL-1β yang dihasilkan pada daerah tumor, dapat memicu kemotaksis dari sel makrofag. Sel makrofag ini akan menghasilkan sitokin IL-1β, sehingga menyebabkan proliferasi sel tumor semakin

meningkat. Namun, IL-1 β juga memiliki efek anti-tumor dan bahkan dual efek.

Gambar 10 menunjukkan peran IL-1 β pada berbagai jenis tumor.



Gambar 10. Efek pro- dan anti- tumor dari IL-1 β .⁹² PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*.

2.1.5. Calcitriol

Vitamin D merupakan vitamin yang larut dalam lemak. Vitamin ini dapat dianggap sebagai pro-hormon yang berperan dalam metabolisme kalsium dan fosfor. Pada manusia, vitamin D dapat dibentuk dari metabolisme saat paparan sinar matahari (yang mengandung sinar ultraviolet B panjang gelombang 290-315 nm) atau asupan diet.⁹³ Vit D yang diberikan dalam bentuk diet makanan, dapat menurunkan risiko timbulnya hiperkalsemia. Pada penelitian preklinis, asupan vit D dapat digunakan sebagai pencegahan kanker kolon, mammae, prostat dan ovarium.⁹⁴ Tetapi efek asupan vit D pada pasien KSS oral belum pernah dilaporkan hingga sekarang, meskipun banyak laporan yang menunjukkan insufisiensi dan

defisiensi vit D3 pada pasien KSS oral. Mekanisme molekular vit D ini juga masih belum diketahui secara jelas, begitu pula dampak jangka panjang penggunaan vit D terhadap progresitas KSS oral.

2.1.5.1. Metabolisme calcitriol

Awalnya vitamin D dalam bentuk hidroksil dalam hepar yang akan diubah menjadi 25-*hydroxycholecalciferol* [25(OH)D₃] dan selanjutnya dihidrolisis dalam ginjal menjadi calcitriol [1,25(OH)₂D₃], yang merupakan bentuk aktif dari vitamin D. Calcitriol (atau disebut juga sebagai analog vitamin D sintetis) akan dikatabolik inaktivasi oleh enzim 24-*hydroxylase* (yang dihasilkan oleh gen *CYP24A1*) dalam ginjal ¹².

2.1.5.2. Peran calcitriol

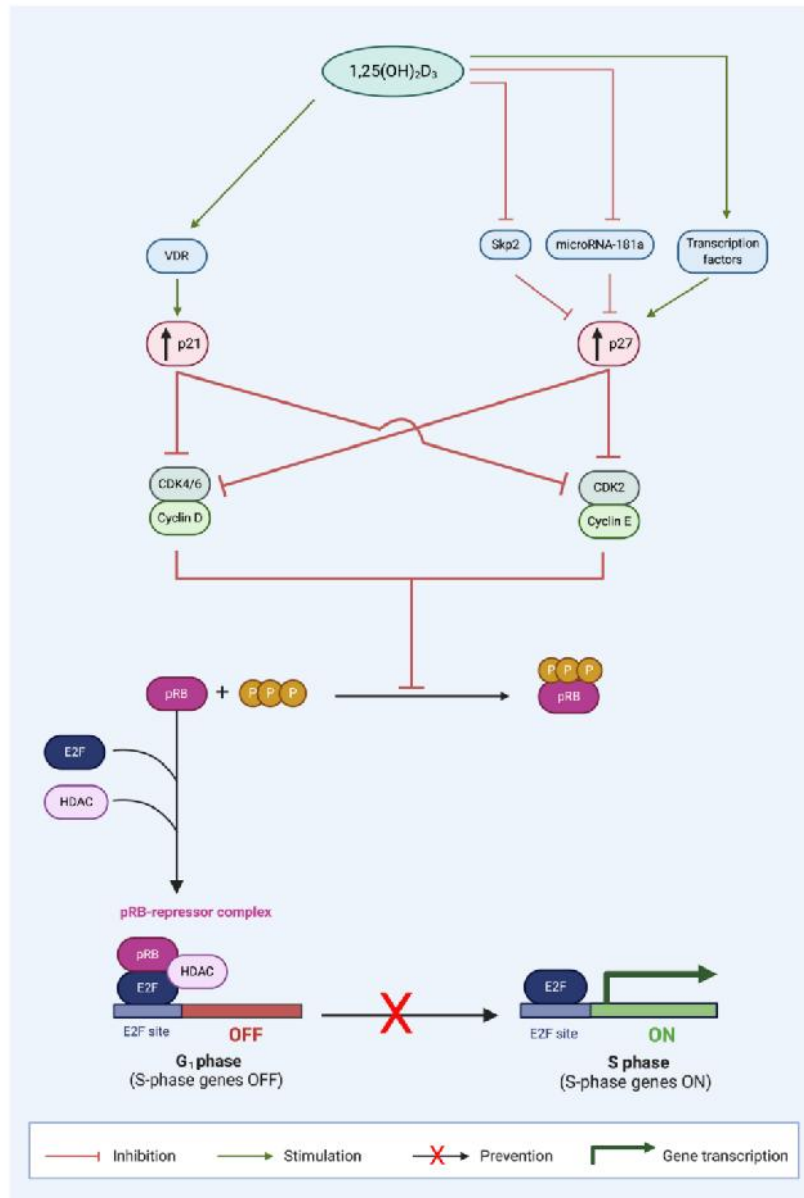
Calcitriol berperan untuk penyembuhan hipokalsemia, osteoporosis dan pencegahan osteoporosis yang disebabkan kortikosteroid. Pemberian secara sistemik juga diindikasikan untuk pasien yang menjalani dialisis ginjal kronis, hipoparatiroidisme, dan pseudohipoparatiroidisme.⁹⁵ Asupan calcitriol juga sangat berguna untuk menurunkan risiko penyakit saat maupun setelah kehamilan, seperti preeklamsia, vaginosis bakterial, diabetes gestational, dan berat badan yang rendah pada bayi baru lahir.⁹⁶

2.1.5.3. Peran calcitriol terhadap kanker

Berdasarkan penelitian Fanidi dkk dan Gupta dkk, kadar vitamin D rendah berhubungan dengan kejadian timbulnya karsinoma sel skuamosa oral.^{97,98} Pada penelitian *in vivo*, juga ditemukan bahwa calcitriol dapat menghambat proliferasi sel kultur KSS.^{99–101} Mekanisme penghambatan sel tumor oleh adanya vitamin D masih belum diketahui secara jelas.

Vitamin D berperan dalam proses preventif dan terapi dari kanker. Calcitriol bekerja melalui aktivasi jalur apoptosis dan menghambat angiogenesis serta potensiasi efek antikanker dari bahan antikanker sitotoksik dan antiproliferatif.¹² Gangguan baik pada *vitamin D receptor* (VDR), sintesis (*25-hydroxylase* dan *1 α -hydroxylase*), katabolisme (*24-hydroxylase*) enzim metabolik vitamin D, diketahui dapat memicu pertumbuhan kanker pada berbagai organ.¹²

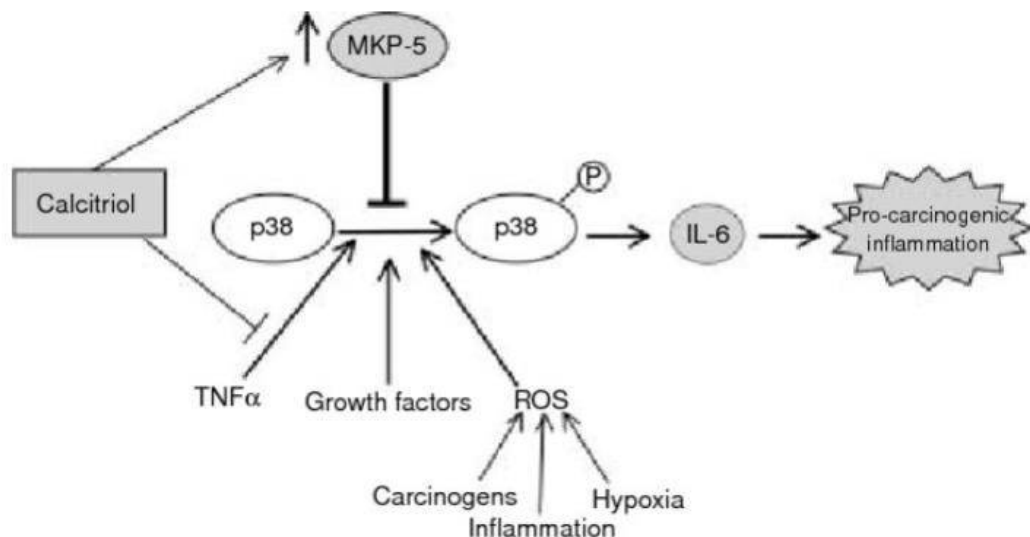
Mekanisme efek anti tumor pada calcitriol terletak di penghentian G0/G1, diferensiasi, induksi apoptosis dan modulasi berbagai jalur persinyalan dalam sel tumor dan penghambatan angiogenesis tumor.^{12,102} Hormon glukokortikoid diketahui dapat meningkatkan potensi anti tumor dari calcitriol dan menurunkan risiko hiperkalsemia akibat calcitriol. Disamping itu, calcitriol juga berinteraksi untuk meningkatkan efek anti tumor dari bahan kemoterapi seperti *platinum analogue*, *taxane* dan *DNA-intercalating agent*.¹² Gambar 11 menunjukkan mekanisme calcitriol dalam menghambat siklus sel. Calcitriol meregulasi ekspresi p21 dan p27 di fase G1 dan menghambat progresitas siklus sel menuju fase S.



Gambar 11. Calcitriol *up-regulate* ekspresi p21 dan p27 di fase G1 dan menghambat progresitas siklus sel menuju fase S. Calcitriol melalui banyak jalur mekanisme, akan meningkatkan ekspresi CDK *inhibitor*, p21 dan p27. Ekspresi p21 meningkat akibat stimulasi pada VDR. Ekspresi p27 meningkat akibat adanya faktor transkripsi.¹⁰²

2.1.5.4. Peran calcitriol pada jalur persinyalan mRNA p38 α MAPK

Pengaruh calcitriol terhadap MAPK sudah dapat ditemukan pada beberapa laporan.^{103,104} Pada sel kultur kanker mammae, ditemukan kadar ERK MAPK mengalami peningkatan, namun dengan pemberian calcitriol, kadar ERK mengalami peningkatan pada kelompok VDR positif.¹⁰⁴ Pada sel prostat, dengan adanya pemberian calcitriol, jalur persinyalan *mitogen-activated protein kinase phosphatase 5* (MKP5) akan menghambat aktivasi dari p38 MAPK (Gambar 12). Disamping itu, calcitriol ini juga akan menghambat pembentukan TNF- α sehingga aktivasi p38 semakin terhambat dan akhirnya terjadi pembentukan sitokin inflamasi IL-6.¹⁰⁵

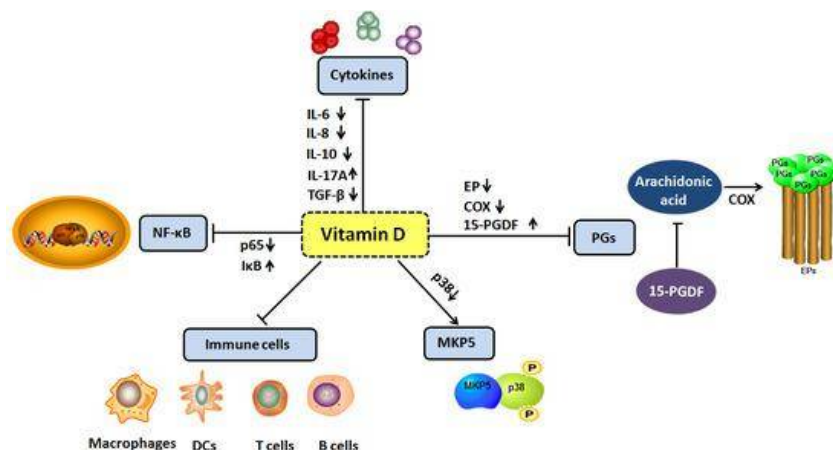


Gambar 12. *mitogen-activated protein kinase phosphatase 5* (MKP5) akan menghambat jalur persinyalan p38 MAPK oleh adanya calcitriol. Pada sel prostat, calcitriol akan meningkatkan ekspresi MKP5, yang dapat menghambat fosforilasi dan aktivasi p38 MAPK, sehingga menyebabkan produksi sitokin pro-inflamasi IL-6.¹⁰⁵

2.1.5.5. Peran calcitriol pada jalur persinyalan mRNA COX-2

Penelitian Suo dkk, ditemukan adanya efek calcitriol terhadap pembentukan COX-1 dan COX-2 pada pasien hipertensi renovaskular.¹⁰⁶ Pemberian calcitriol pada pasien tersebut, menyebabkan penurunan ekspresi COX-1 dan COX-2, sehingga terjadi penyembuhan penyakit. Pada sel kultur kanker mammae, kombinasi calcitriol dan celecoxib dapat menghambat pertumbuhan sel tumor.¹⁰⁷ Pada penelitian pasien kanker kolorektal, seiring dengan progresitas stadium kanker, ditemukan bahwa kadar *vitamin D receptor* (VDR) mengalami penurunan dan kadar COX-2 mengalami peningkatan.²⁹

Gambar 13 menunjukkan pengaruh pemberian vitamin D terhadap proses inflamasi yang terjadi selama tumorigenesis. Calcitriol diketahui dapat (1) meregulasi berbagai sitokin (IL-6, IL-8, IL-17A, IL-10 dan TGF- β); (2) menghambat jalur persinyalan NF- κ B; (3) meningkatkan regulasi MAPK; (4) menghambat pembentukan prostaglandins (PG) melalui supresi *PG receptors* (EPs), penurunan ekspresi COX-2 dan peningkatan ekspresi 15-PGDH; (5) penghambatan sel imun (makrofag, sel limfosit B dan T) melalui VDR.¹⁰⁸

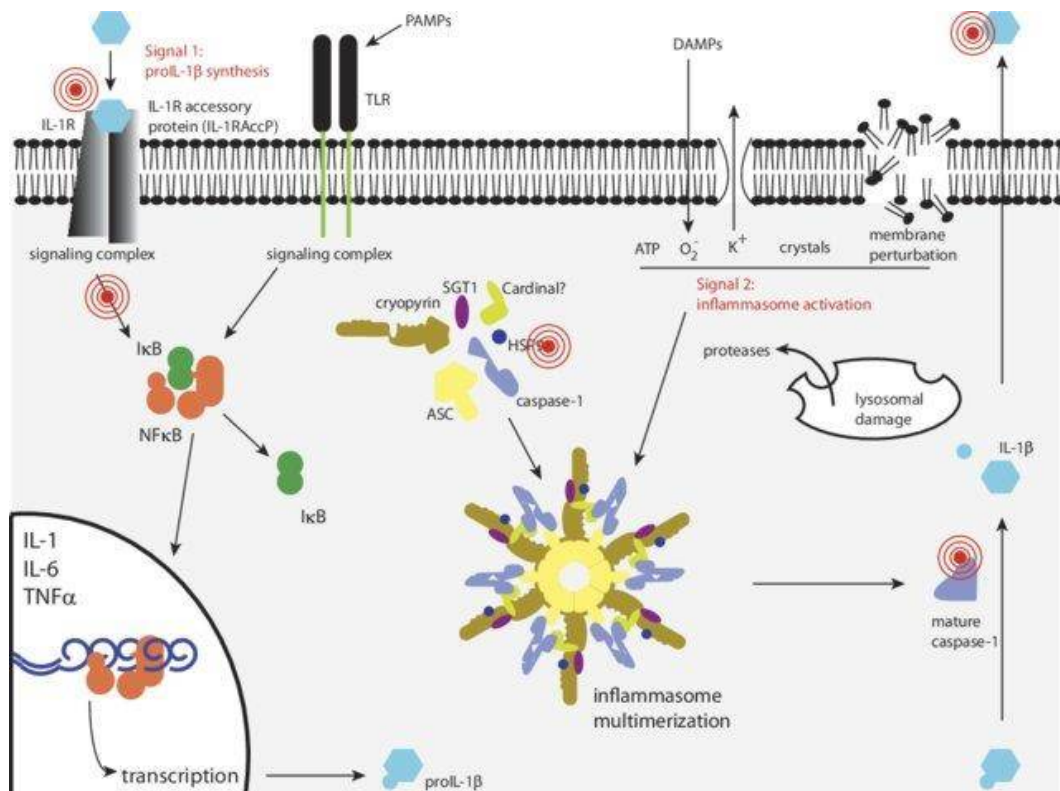


Gambar 13. Efek vitamin D terhadap inflamasi.¹⁰⁸

2.1.5.6. Peran calcitriol pada jalur persinyalan mRNA caspase-1 dan IL-1 β

Caspase telah diketahui berperan dalam apoptosis sel ¹⁰⁹. Pemberian calcitriol dapat menyebabkan peningkatan kadar caspase-3, caspase-8, dan caspase-9 pada sel kultur B16–F10 dibandingkan kelompok yang hanya diberikan cisplatin.¹¹ Menurut Zemel dan Sun, diketahui bahwa dosis calcitriol rendah (0.1 nm–10 nm) dapat menghambat ekspresi gen apoptosis, yaitu caspase-1 dan caspase-3; dan menstimulasi ekspresi anti-apoptosis BCL-2. Tetapi pada dosis tinggi (100 nM) menyebabkan ekspresi caspase-1 dan caspase-3 serta menghambat ekspresi BCL-2.¹¹⁰

Gambar 14 menunjukkan peran caspase-1 dan IL-1 dalam proses inflamasi. Dengan adanya DAMP dan PAMP, akan mengaktivasi inflammasom sehingga menyebabkan pembentukan caspase-1. Aktivasi ini menyangkut beberapa jalur persinyalan, antara lain *K efflux secondary to ATP-gated channels*, ROS, dan pertubasi membran. Caspase-1 yang teraktivasi akan menyebabkan perubahan pro-IL-1 menjadi IL-1 dan dilepaskan keluar dari sel. Setelah dilepaskan, IL-1 akan mengalami ikatan dengan IL-1R, sehingga berlanjut mengikuti kaskade inflamasi yang juga melibatkan sitokin proinflamasi lainnya.¹¹¹



Gambar 14. Peran caspase-1 dan IL-1-dalam inflamasi. Dalam proses ini, inflammasom merupakan kompleks protein intraselular yang teraktivasi oleh adanya berbagai faktor, termasuk *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) dan PAMPs.¹¹¹

2.2. Kerangka Pemikiran

Penggunaan obat antikanker cisplatin terhadap proliferasi karsinoma sel skuamosa telah terbukti dapat memberikan efek penyembuhan kanker.⁵⁰ Namun, cisplatin yang digunakan sebagai pengobatan tunggal, ternyata kurang efektif jika dibandingkan kombinasi terhadap bahan lain yaitu calcitriol (vitamin D sintetis). Banyak publikasi yang telah menunjukkan efektivitas calcitriol terhadap berbagai jenis tumor solid, namun mekanisme molekularnya masih belum dimengerti secara jelas.⁹⁴

Calcitriol akan berikatan dengan VDR (*vitamin D receptor*) sehingga menyebabkan penurunan ekspresi p38 α MAPK.¹¹² Penghambatan p38 α MAPK, akan menyebabkan gangguan homeostasis mitokondrial sehingga menimbulkan peningkatan ROS dan RNS (*reactive nitrogen species*).^{37,113} ROS dan RNS berperan dalam awal proses inflamasi. Disamping itu, dengan adanya jumlah ROS yang meningkat, justru akan menghambat ekspresi p38 α MAPK melalui fosfatase MAPK.¹¹³

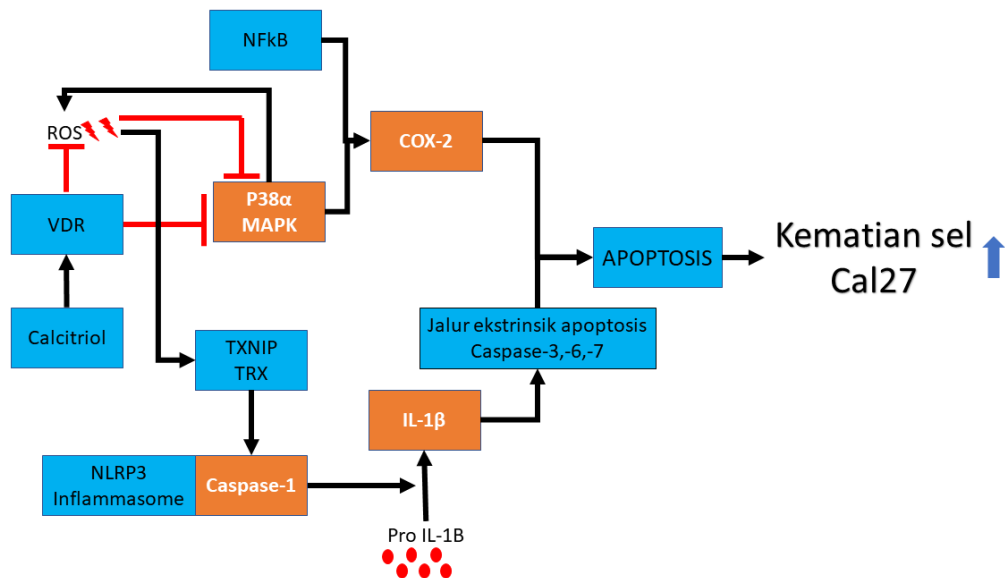
Sel yang mengalami proses inflamasi dalam *tumor microenvironment* akan menyebabkan pembentukan ROS secara berlebihan melalui aktivasi enzim seperti *nitric oxide synthase* (iNOS), *myeloperoxidase* (MPO), *NADPH oxidase*, dan *xanthine oxidase* (XO), dan *up-regulating cyclooxygenase 2* (COX-2) dan *lipoxigenase* (LOX).¹¹⁴ Akumulasi ROS ini juga menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA, RNA, protein selular dan ekstraselular, karbohidrat, lipid dan mitokondria itu sendiri.^{114,115} Selanjutnya *free fatty acid* (FFA) yang terlepas, akan berikatan dengan TLR2 dan TLR4, menyebabkan aktivasi NF- κ B dan sitokin proinflamasi (pro-IL-1 β).¹¹⁵

ROS yang terbentuk akan mengaktivasi TNFR1 (*TNF receptor superfamily 1*) dan TXNIP (*Thioredoxin interacting protein*) sehingga menyebabkan aktivasi NLRP3.^{116,117} NLRP3 *inflammasome* berperan penting dalam proses inflamasi dan respon imun untuk aktivasi caspase-1.¹¹⁸ Dalam stres oksidatif, TXNIP dilepaskan dari *oxidized* TRX dan mengikat pada NLRP3 *inflammasome*, sehingga mengaktivasi pelepasan IL-1 β dan IL-18, yang ditandai adanya respon imun berupa inflamasi.^{117,119,120} Dalam sitoplasma, TXNIP yang berlebihan akan dibawa dari

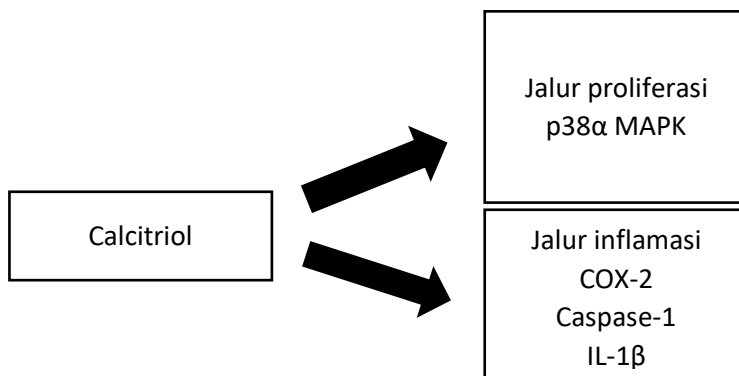
nukleus ke mitokondria, mengikat TRX1 dan melepaskan ASK-1, sehingga mengaktifkan jalur p38 MAPK dan menyebabkan apoptosis.^{121–123}

p38 MAPK akan mengaktivasi kompleks protein NLRP3/Caspase-1/ASC (disebut juga NLRP3 *inflammasome*). Kompleks protein ini akan mengalami perubahan menjadi caspase-1 aktif yang akan mengubah pro-IL-1 β menjadi IL-1 β .¹²⁴ Caspase-1 juga dipengaruhi oleh adanya aktivitas COX-2. Pada sel kultur Hela, ditemukan bahwa penggunaan NF- κ B inhibitor dan COX-2 inhibitor secara signifikan menurunkan konsentrasi caspase-1.¹²⁵ IL-1 β yang berlebihan akan menyebabkan apoptosis melalui jalur ekstrinsik yaitu terjadi aktivasi caspase-3, caspase-6 dan caspase-7.¹²⁶

p38 MAPK dan NF- κ B secara bersama-sama akan mengatur keseimbangan COX-2.²⁷ COX-2 berperan penting dalam proses inflamasi dan kanker. COX-2 ini dapat memodulasi proliferasi sel dan apoptosis. Inhibitor COX-2 akan menyebabkan apoptosis melalui jalur persinyalan NF- κ B.¹²⁵



Gambar 15. Alur kerangka pemikiran. MAPK = *Mitogen-activated protein kinase*; COX-2 = *cyclooxygenase-2*; ROS = *reactive oxygen species*; TXNIP = *Thioredoxin interacting protein*; TRX = *Thioredoxin 1*; IL-1 β = *interleukin 1 β*



Gambar 16. Kerangka konsep.

Premis 1

Calcitriol secara signifikan meningkatkan ekspresi VDR (*vitamin D receptor*) dan menghambat ekspresi p38 α MAPK menyebabkan apoptosis sel epitel yang mengalami inflamasi.¹¹²

Premis 2

Pada *in vitro*, calcitriol menyebabkan gangguan homeostasis mitokondrial melalui jalur PI3K-AKT-mTOR dan menghambat autofagi, sehingga menyebabkan kematian sel.³⁷ Dengan penghambatan p38 α MAPK, menyebabkan peningkatan ROS pada sel kanker.

Premis 3

ROS yang terbentuk akan mengaktivasi TNFR1 (*TNF receptor superfamily 1*) dan TXNIP (*Thioredoxin interacting protein*) sehingga menyebabkan aktivasi NLRP3 dan apoptosis.^{116,117}

Premis 4

NLRP3 *inflammasome* merupakan kompleks poliprotein intraselular yang terdiri dari NOD-like receptor family protein 3 (NLRP3), *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC), dan *pro-cysteiny l aspartate specific proteinase-1* (pro-caspase-1), yang berperan penting dalam proses inflamasi dan respon imun untuk aktivasi caspase-1.¹¹⁸

Premis 5

P38 MAPK akan mengaktivasi kompleks protein NLRP3/Caspase-1/ASC (disebut juga NLRP3 *inflammasome*; ASC atau PYCARD=*Apoptosis-associated speck-like*

protein containing a CARD) dan mengalami perubahan menjadi caspase-1 aktif yang akan mengubah pro-IL-1 β menjadi IL-1 β .¹²⁴

Premis 6

Sekresi IL-1 β yang berlebihan akan menyebabkan peningkatan apoptosis melalui jalur caspase-3.¹²⁷

Premis 7

Jalur persinyalan mRNA p38 MAPK dan NF- κ B mengatur keseimbangan ekspresi COX-2 (*cyclooxygenase-2*).²⁷

Premis 8

Terdapat hubungan kompleks antara inflamasi kronis, akumulasi ROS dan progresitas kanker. Sel inflamasi dalam tumor microenvironment akan menyebabkan pembentukan ROS secara berlebihan, sehingga mengakibatkan kerusakan oksidatif pada DNA, RNA, protein, lipid dan mitokondria.¹¹⁴

Premis 9

COX-2 berperan penting dalam proses inflamasi dan kanker yang dapat memodulasi proliferasi sel dan apoptosis.¹²⁸

Premis 10

Penghambatan ekspresi COX-2 menyebabkan apoptosis melalui jalur persinyalan NF- κ B dan FHC (*ferritin heavy chain*).¹²⁵

2.3. Hipotesis

- 2.3.1. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAP kinase pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol. (Premis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)
- 2.3.2. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA COX-2 pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol. (Premis 1, 7, 9, 10)
- 2.3.3. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA Caspase-1 pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol. (Premis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8)
- 2.3.4. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA IL-1 β pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol. (Premis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorik untuk menguji daya antikanker calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin dan calcitriol terhadap pertumbuhan sel CAL27 melalui jalur persinyalan mRNA p38 α MAPK, COX-2, Caspase-1 dan IL-1 β .

3.2. Sampel Penelitian

Sampel sel yang digunakan adalah kultur sel ATCC Cal27. Cal27 ini merupakan cell line dari karsinoma sel skuamosa yang dibeli dari *American Type Culture Collection* (ATCC).

Sampel penelitian untuk uji viabilitas terdiri dari 3 kelompok, yaitu
Kelompok perlakuan A: kelompok yang diberi perlakuan dengan calcitriol.

(dosis 3.91 μ M, 7.81 μ M, 15.63 μ M, 31.25 μ M, 62.50 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M)

Kelompok perlakuan B: kelompok (kontrol positif) yang diberi perlakuan dengan cisplatin. (dosis 0.78 μ M, 1.56 μ M, 3.13 μ M, 6.25 μ M, 12.50 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M)

Kelompok perlakuan C: kelompok yang diberi perlakuan dengan kombinasi cisplatin dan calcitriol. (dosis calcitriol + cisplatin 3.91 μ M, calcitriol + cisplatin 7.81 μ M, calcitriol + cisplatin

15.63 μ M, calcitriol + cisplatin 31.25 μ M, calcitriol +
cisplatin 62.50 μ M, calcitriol + cisplatin 125 μ M,
calcitriol + cisplatin 250 μ M, calcitriol + cisplatin 500
 μ M)

Sampel penelitian untuk uji ekspresi mRNA terdiri dari kelompok:

Kontrol negatif: medium.

Kontrol positif: cisplatin.

Kelompok calcitriol: 1/10 IC₅₀, 1/4 IC₅₀, 1/2 IC₅₀, 1x IC₅₀.

Kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol: 1/10 IC₅₀, 1/4 IC₅₀, 1/2 IC₅₀, 1x IC₅₀.

3.3. Metodologi Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorik untuk menguji daya antikanker calcitriol, cisplatin dan kombinasi calcitriol-cisplatin terhadap pertumbuhan karsinoma sel skuamosa pada sel kultur CAL27. Metode yang dipakai adalah uji viabilitas dan uji real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

3.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas: calcitriol, cisplatin dan kombinasi calcitriol-cisplatin

Variabel tergantung: ekspresi p38 α MAPK, COX-2, Caspase-1 dan IL-1 β .

3.5. Definisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi operasional variabel.

Variabel	Definisi Operasional Variabel	Cara pengukuran	Hasil ukur	Skala
Calcitriol (bebas)	Calcitriol (1,25-(OH) ₂ D ₃) adalah bentuk terhidroksilasi aktif analog vitamin D yang dilarutkan dalam DMSO (dimetil sulfoxide). Calcitriol diketahui memiliki potensi apoptosis pada karsinoma sel skuamosa. ¹²⁹ Konsentrasi yang digunakan untuk uji viabilitas adalah 3.91 µM, 7.81 µM, 15.63 µM, 31.25 µM, 62.50 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM. Konsentrasi yang digunakan untuk uji ekspresi masing-masing penanda biologis adalah 1/10 IC ₅₀ , 1/4 IC ₅₀ , 1/2 IC ₅₀ , 1x IC ₅₀ .	Spektrofotometer	µg/mL	Nominal
Cisplatin (bebas) kontrol positif	Cisplatin (CAS No. 15663-27-1, MF-Cl ₂ H ₆ N ₂ Pt; NCF-119875), cisplatinum, atau dikenal sebagai <i>cis-diamminedichloroplatinum(II)</i> adalah sebuah bahan <i>platinum based chemotherapeutic</i> yang memiliki daya antikanker. ¹³⁰ Konsentrasi yang digunakan untuk uji viabilitas sel adalah 0.78 µM, 1.56 µM, 3.13 µM, 6.25 µM, 12.50 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM. Konsentrasi yang digunakan untuk uji ekspresi masing-masing penanda biologis adalah 1/10 IC ₅₀ , 1/4 IC ₅₀ , 1/2 IC ₅₀ , 1x IC ₅₀ .	Spektrofotometer	µg/mL	Nominal
Kombinasi calcitriol dan cisplatin (bebas)	Kombinasi calcitriol dan cisplatin adalah kombinasi bahan antikanker analog vitamin D dan bahan <i>platinum based chemotherapeutic</i> . Konsentrasi yang digunakan untuk uji viabilitas sel adalah calcitriol + cisplatin 3.91 µM calcitriol + cisplatin 7.81 µM calcitriol + cisplatin 15.63 µM calcitriol + cisplatin 31.25 µM calcitriol + cisplatin 62.50 µM calcitriol + cisplatin 125 µM calcitriol + cisplatin 250 µM calcitriol + cisplatin 500 µM Konsentrasi yang digunakan untuk uji ekspresi masing-masing penanda biologis	Spektrofotometer	µg/mL	Nominal

	adalah 1/10 IC50, 1/4 IC50, 1/2 IC50, 1x IC50.			
mRNA p38α MAPK	p38α MAPK adalah salah satu isoform mitogen-activated protein kinase yang berperan dalam <i>cell-cycle arrest</i> dan apoptosis. ⁶³	Real time PCR	arbitrary unit (AU)	Rasio
mRNA COX-2	COX-2 atau <i>prostaglandin-endoperoxide synthase</i> merupakan enzim yang disekresikan oleh cancer-associated fibroblasts (CAFs), sel makrofag tipe 2, dan sel kanker pada tumor <i>microenvironment</i> . COX-2 dapat memicu aktivitas seperti <i>cancer stem cell</i> , induksi resisten terhadap apoptosis, memicu proliferasi, angiogenesis, inflamasi, invasi dan metastasis sel kanker. ¹³¹	Real time PCR	arbitrary unit (AU)	Rasio
mRNA Caspase-1	Caspase-1 adalah enzim yang dilepaskan karena adanya stimulus inflamasi. ⁷⁸ Efek antitumor caspase-1 masih diperdebatkan karena hasil yang berbeda-beda antara berbagai jenis tumor.	Real time PCR	arbitrary unit (AU)	Rasio
mRNA dan protein IL-1β	IL-1β adalah sitokin yang berperan dalam memicu pertumbuhan (angiogenesis, pertumbuhan sel, invasi dan metastasis, modulasi <i>tumor microenvironment</i>) karsinoma sel skuamosa. ⁹⁰ Pemeriksaan IL-1β menggunakan 2 tehnik yaitu analisis mRNA menggunakan RT-PCR.	Real time PCR	arbitrary unit (AU)	Rasio
Nilai absorbansi sel	Kuantitas cahaya yang dipakai untuk diabsorpsi oleh larutan. Absorbansi yang dipakai dalam penelitian ini adalah 570nm dan 600nm	Spektrofotometer	μg/mL	Rasio
Nilai viabilitas sel	Angka yang menunjukkan rasio dari jumlah sel awal dikurangi jumlah sel yang mati, yang akan dibandingkan dengan jumlah sel awal.	Spektrofotometer	%	Rasio

3.6. Alat dan Bahan

3.6.1. Alat

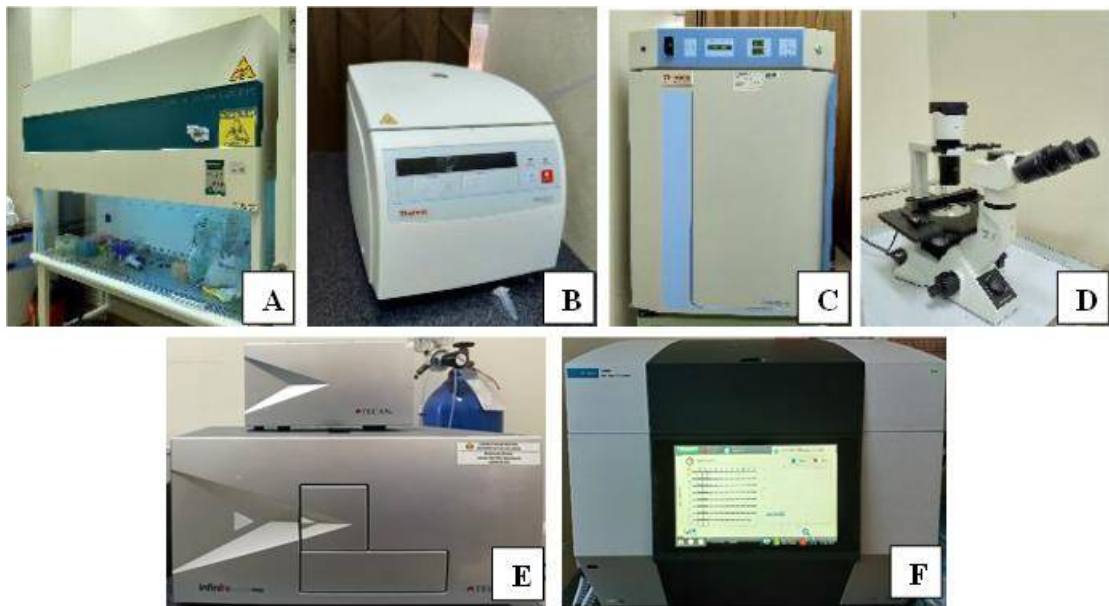
1. Biosafety Cabinet (BSC) Class II, Type A2
2. Microsentrifuge
3. Microscope

4. Mikropipet
5. CO2 Incubator
6. Vortex
7. Microplate Reader
8. Elektroforesis
9. Reader

3.6.2. Bahan

1. 1.5 mL *microtube*
2. 15 mL tube
3. 75 ml T-Flask
4. 96 well plate
5. Cisplatin
6. Zat aktif Calcitriol
7. Antibiotik
8. Media DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*)
9. *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)
10. *Phosphate Buffered Saline* (PBS)
11. PrestoBlue™ Cell Viability Reagent
12. *Fetal Bovine Serum* (FBS)
13. Trypsin-EDTA
14. *Lysis buffer*
15. *Polyacrylamide gel*

16. *Running buffer*
17. *Transfer buffer*
18. TBST/ PBST
19. *Blocking solution*
20. *Chemiluminescence agent*
21. Primer p38 α MAPK, COX-2, Caspase-1, IL-1 β dan GAPDH



Gambar 17. Peralatan yang digunakan dalam penelitian. A – BSC; B – *Microcentrifuge*; C – *CO2 incubator*; D – *Inverted microscope*; E – *multimode reader nano quant*; F – PCR.

3.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi: Lab sentral Universitas Padjadjaran

Waktu Penelitian: Desember 2022-Februari 2023

3.8. Prosedur Penelitian

3.8.1. Persiapan dan penentuan dosis sampel

Penelitian ini memakai 3 jenis bahan uji yaitu cisplatin, calcitriol, kombinasi calcitriol dan cisplatin. Calcitriol yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari calcitriol sintesis Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran, Jatinangor. Zat aktif calcitriol dilarutkan dalam DMSO (*dymetil sulfoxide*) dan diberi perlakuan ke sel kultur dengan konsentrasi berbeda (500 μM sampai dengan 3,91 μM). Untuk bahan uji cisplatin, cisplatin dilarutkan ke dalam media komplit dan diberi perlakuan ke sel kultur dengan konsentrasi yang sama dengan calcitriol (100 μM sampai dengan 0,78 μM). Untuk bahan uji kombinasi calcitriol dan cisplatin, cisplatin 5.3 μM yang telah dilarutkan dalam media, dicampurkan ke dalam calcitriol yang telah dilarutkan dalam DMSO, dan dilakukan pengenceran sehingga konsentrasi yang didapat sama dengan sampel sebelumnya (500 μM sampai dengan 3,91 μM) dengan konsentrasi tetap cisplatin 5.3 μM .

3.9. Pelaksanaan Penelitian

Alur kerja secara umum pada penelitian ini adalah:

1. Kultur sel dimasukkan ke dalam 96 *well plate* lalu diinkubasi (pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂ hingga persentase pertumbuhan sel mencapai 70%).
2. Sel diberikan perlakuan bahan uji lalu di inkubasi (selama 24 jam pada pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂)
3. Reagen kerja *presto blue* ditambahkan pada sel kultur.
4. Pengukuran absorbansi menggunakan *Multimode Reader*.

3.9.1. Persiapan media kontrol positif.

1. Persiapan media kultur DMEM (mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, antibiotik, hidrokortison).
2. Persiapan kontrol positif berupa cisplatin dan DMSO sebagai kontrol pelarut.
3. Sampel dilarutkan dengan konsentrasi akhir tertentu sebagai stok. Gunakan pelarut yang tidak bersifat toksik terhadap sel.
4. Untuk dosis cisplatin, larutkan cisplatin 1 mg/mL dalam 1000 μ L dengan pelarut NaCl fisiologis yang ditambahkan dengan medium komplet.
5. Larutan kerja yang akan digunakan adalah *PrestoBlue™ Cell Viability Reagent* (larutan kerja antiproliferasi assay).

3.9.2. Persiapan dan seeding sel ke dalam 96 well plate.

1. Sel yang akan digunakan telah konfluen min 70%.
2. Media dipindahkan pada disc, lalu sel dibilas sebanyak 2 kali dengan menggunakan 5 mL PBS.
3. 1 mL larutan Trypsin-EDTA ditambahkan ke dalam media, lalu inkubasi selama 5 menit agar lapisan sel terdispersi (di bawah mikroskop inverted, sel akan tampak melayang).
4. Sel dipindahkan ke dalam *tube* yang telah berisi media.
5. Sel disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit.
6. Supernatan dibuang, lalu pelet dilarutkan ke dalam *tube* berisi media.

7. Jumlah dan viabilitas sel dihitung, lalu *resuspend* sel dengan kepadatan sel akhir yang sesuai.
8. Selanjutnya dilakukan kulturisasi sel ke dalam 96 *well plate*, kemudian diinkubasi selama 24 jam (atau sampai sel konfluen min. 70%) pada suhu 37°C dan 5% gas CO₂.

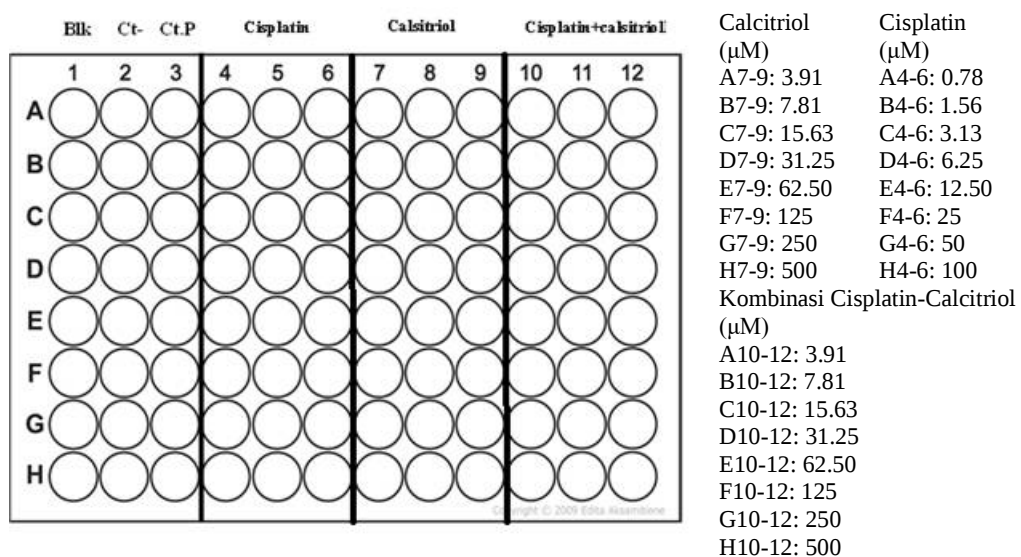
3.9.3. Perlakuan sel

1. *Microcentrifuge tube* disiapkan, lalu masing-masing *microcentrifuge tube* diberi label konsentrasi yang sesuai, kemudian stok sampel diencerkan sesuai dengan konsentrasi: cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin dan Calcitriol yang kemudian akan dimasukkan ke dalam *Microcentrifuge tube* yang telah diberi label.
2. 96 *well plate* yang telah berisi sel dikeluarkan dari inkubator. Label dipasankan pada *plate* untuk baris mana yang akan diberi perlakuan oleh standar dan baris mana yang akan diberi sampel. Kemudian media dibuang dari setiap *well*.
3. Masing-masing larutan sampel dipindahkan sebanyak 1.000 µL, kontrol positif cisplatin dan kontrol pelarut DMSO dengan menggunakan mikropipet ke dalam masing-masing *well* yang sesuai pada 96 *well plate* yang telah berisi sel.
4. Inkubasi dilakukan kembali selama 24 jam. Perubahan sel dan jumlah sel yang mati diamati setelah 24 jam setelah diberikan perlakuan.

3.9.4. Pemberian reagen Presto Blue dan pengukuran absorbansi

1. Media dibuang pada setiap *well*.

- Media 9 mL dipersiapkan pada *falcon tube* yang ditambahkan 1 mL “*PrestoBlue™ Cell Viability Reagent*” (10 µL reagen untuk 90 µL media), lalu dimasukkan 100 µL campuran larutan tersebut ke dalam tiap *well microplate*, kemudian diinkubasi selama 1-2 jam sampai terlihat perubahan warna (saat memasuki sel hidup, reagen *PrestoBlue®* akan direduksi dari senyawa biru resazurin tanpa nilai fluorescent intrinsik, menjadi senyawa resorufin yang berwarna merah dan sangat berpendar. Konversi nilai sebanding dengan jumlah sel yang aktif secara metabolik dan oleh karena itu dapat diukur secara kuantitatif. Untuk mengukur absorbansi, digunakan spektrum absorbansi untuk resazurin dan resorufin)
- Ukur absorbansi pada panjang gelombang 570 nm dan 600 nm menggunakan *multimode reader*.



Gambar 18. Layout penelitian menggunakan 96 well plate. Blk = blanko (media); Ct- = kontrol negatif (media dan sel); Ct.P = kontrol pelarut (DMSO 2%).

3.9.5. Perhitungan viabilitas sel

1. Angka hasil pengukuran absorbansi akan langsung terlihat pada layar. Ada tiga hasil pengukuran: 570 nm, 600 nm, dan selisih kedua absorbansi.
2. Perhitungan *Corrected Absorbance* dengan rumus:

$$\text{Corrected Absorbance} = (A_{570} - A_{600})_{\text{sampel}} - \sum (A_{570} - A_{600})_{\text{Media}}$$

3. Setelah didapatkan *corrected absorbance* dari masing-masing kelompok sampel, lalu dihitung presentase dari viabilitas sel dengan rumus:

$$\% \text{Viabilitas sel} = \frac{A_{\text{perlakuan}} - A_{\text{Kontrol Media}}}{A_{\text{Kontrol Pelarut}} - A_{\text{Kontrol Media}}} \times 100$$

4. Selanjutnya dibuat grafik dari hasil absorbansi dan % viabilitas sel, kemudian tentukan IC_{50} berdasarkan rumus linear pada grafik (target absorbansi 50% dari hasil absorbansi kontrol negatif/kontrol pelarut).

3.9.6 RT-PCR

3.9.6.1. Isolasi RNA metode TRIsure

1. Homogenisasi

Homogenisasi dilakukan pada sampel jaringan ke dalam 200 mL TRIsure per 50-100 mg sel, lalu dipindahkan homogenat ke tabung baru.

2. Fase pemisahan

Sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 40 mL kloroform per 200 mL TRIsure yang digunakan. Tutup tabung dengan aman dan kocok kuat-kuat dengan tangan selama 15 detik. Sampel diinkubasi selama 3 menit pada suhu kamar. Kemudian, sampel disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit. Sampel akan terpisah

menjadi fase organik, interfase, dan fase air atas yang tidak berwarna dan lapisan air dipisahkan untuk ekstraksi RNA.

3. Pengendapan RNA

Fase air diambil dengan sangat hati-hati, tanpa mengganggu interfase ke tabung lain. RNA diendapkan dengan cara mencampur menggunakan isopropanol. Sebanyak 100 μ L isopropanol per 200 mL TRIsure yang digunakan. Sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar kemudian sentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit.

4. Pembilasan RNA

Supernatan dibuang dan dibilas pelet sekali dengan etanol 75%, tambahkan 200 mL etanol per 200 mL TRIsure yang digunakan sampel pusaran dan sentrifuse pada 7500 rpm selama 5 menit pada 4 °C.

5. Melarutkan kembali RNA

Pelet dikeringkan setelah larutan etanol dibuang dan dilarutkan dalam air PCR. Inkubasi dilakukan selama 10 menit pada suhu 60 °C dengan menggunakan *heat block*. RNA disimpan dalam suhu -70 °C. Prosedur sebelum masuk ke PCR, dilakukan preparasi dengan memasukkan *reagen* ke dalam *microtube*.

Tabel 6. *Reagen* untuk RT-PCR

<i>Reagen</i>	<i>Volume</i>
2x SensiFAST SYBR No-ROX One Step Mix	5 μ L
10 μ M <i>Forward Primer</i>	0.4 μ L
10 μ M <i>Reverse Primer</i>	0.4 μ L
<i>Reverse transcriptase</i>	0.1 μ L
RiboSafe RNase <i>Inhibitor</i>	0.2 μ L
<i>Water</i>	1.9 μ L
<i>Template (Sample)</i>	2 μ L (Conc. 250 ng)

3.9.6.2. Prosedur RT-PCR untuk ekspresi MAPK

Berikut adalah tiga tahapan kerja PCR dalam satu siklus:

1. Tahap peleburan (*melting*) atau denaturasi. Pada tahap ini (berlangsung pada suhu tinggi, 94–96°C) ikatan hidrogen DNA akan mengalami pemutusan (denaturasi) dan DNA menjadi berberkas tunggal atau RNA. Biasanya pada tahap awal PCR ini dilakukan agak lama (sampai 5 menit) untuk memastikan semua berkas DNA terpisah. Pemisahan ini menyebabkan DNA tidak stabil dan siap menjadi templat ("patokan") bagi primer. Durasi pada tahap ini selama 1–2 menit.
2. Tahap penempelan atau *annealing*. Primer menempel pada bagian DNA template yang komplementer urutan basanya. Tahapan ini dilakukan pada suhu antara 45–60°C. Penempelan ini bersifat spesifik. Suhu yang tidak tepat dapat menyebabkan tidak terjadinya penempelan atau bahkan primer menempel di sembarang tempat. Durasi tahap ini 1–2 menit.
3. Tahap pemanjangan atau *elongasi*. Suhu untuk proses ini tergantung dari jenis DNA polimerase yang dipakai. Dengan Taq-polimerase, proses ini biasanya dilakukan pada suhu 76°C. Durasi tahap ini selama 1 menit.

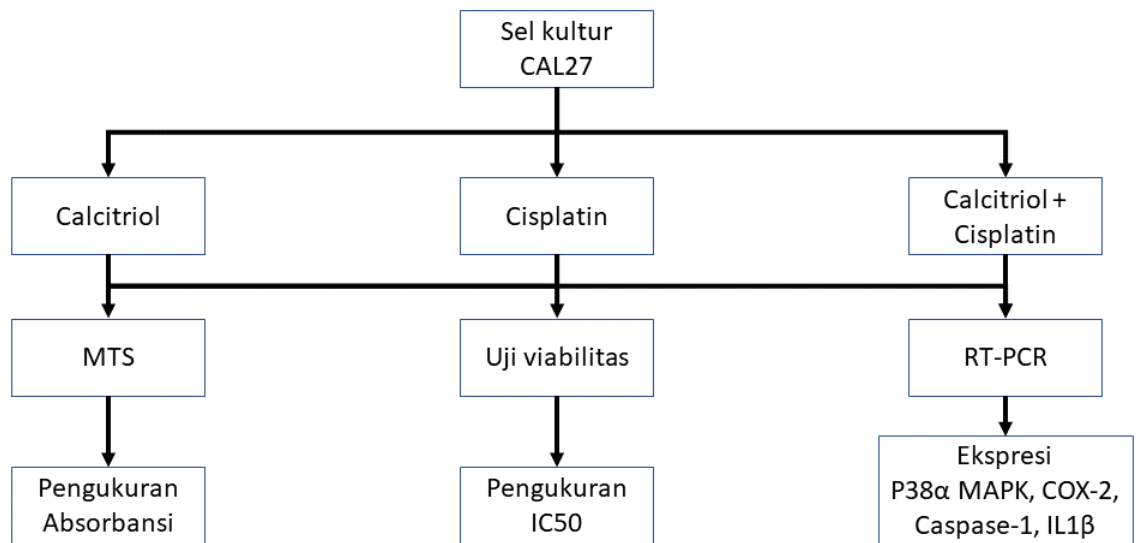
Tabel 7. Sekuens primer untuk pemeriksaan PCR

Simbol Gen	Sekuens Primer	Referensi
GAPDH_qh	(F)GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA (R)GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	132
P38 α MAP Kinase	(F) TCAGTCCATCATTTCATGCGAAA (R) AACGTCCAACAGACCAATCAC	71
COX-2	(F) CTCCTTGAACACGGACTTGC (R) TCAGGGAGAAGCGTTTGC	133
Caspase-1	(F) 5'-ACACGTCTTGCCCTCATTATCT-3' (R) 5'-ATAACCTTGGGCTTGTCTTTCA-3'	134
IL-1B	Primer sekuens untuk qPCR dan PCR (F) 5'-TACCTGTCCTGCGTGTTGAA-3' (R) 5'-TCTTTGGGTAATTTTGGGATCT-3'	135

3.9.6.3. Seting mesin PCR

1. Mesin *thermal cycler* disambungkan dengan arus listrik.
2. Dalam menu, dipilih program yang akan dijalankan melalui “File” kemudian pilih “Edit”.
3. Selanjutnya pilih “Program”, klik tombol “Edit”
4. Suhu diatur sesuai pengkondisian awal pada menu “Header”.
5. Selanjutnya pilih “Step” untuk mengatur jumlah siklus dan suhu disetiap *step* yang diinginkan.
6. Kemudian pilih “Save”, tekan tombol “Run”.
7. Tombol “Start” dipilih, pilih program yang sudah diatur, tekan tombol “Start Now”.
8. Proses ditunggu hingga selesai. Selesai tahap 3, maka siklus diulang kembali mulai tahap 1.

3.10. Bagan alur penelitian



Gambar 19. Alur penelitian.

3.11. Analisis Data

1. Analisis RT-qPCR menggunakan metode Livak

Hasil tes RT-qPCR akan memberikan nilai skor *Ct target average* dan *Ct reference average* baik pada suhu 25°C maupun 40°C. Selanjutnya lakukan perhitungan sebagai berikut:

- a. Menghitung ΔCt (perubahan *Ct*) untuk kelompok perlakuan dan kontrol

Kelompok perlakuan : $\Delta Ct(\text{perlakuan}) = Ct(\text{target}) - Ct(\text{reference})$

Selanjutnya lakukan perhitungan untuk ΔCt kelompok kontrol

Kelompok kontrol : $\Delta Ct(\text{perlakuan}) = Ct(\text{target}) - Ct(\text{reference})$

- b. Hitung $\Delta\Delta Ct$ untuk kelompok perlakuan dan kontrol

Rumus: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{perlakuan}) - \Delta Ct(\text{kontrol})$

- c. Hitung $2^{-\Delta\Delta C_t}$ untuk menghasilkan rasio ekspresi

Rumus: $expression\ ratio = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

- d. Lakukan interpretasi antara suhu 25°C dan 40°C untuk besaran berapa kali lipatnya.

2. Uji distribusi normal dan homogenitas data

Untuk menentukan data distribusi normal atau tidak, dilakukan uji normalitas data. Saphiro-Wilk *test* untuk data yang kurang dari 40. Bila data terdistribusi normal menunjukkan nilai kemaknaan $p > 0.05$. Untuk menguji homogenitas data, digunakan *Levene test for homogeneity of variance*. Data yang homogen ditunjukkan dari nilai kemaknaan $p > 0.05$. Uji Levene ini ditujukan untuk kelompok yang berbeda jumlah sampelnya, jika jumlah sampel antara kelompok adalah sama, maka tidak diperlukan uji tersebut.

3. Analisis multivariat

- a. Jika hasil data terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk menganalisis perbedaan hasil PCR dan Western Blot variabel antara tiap dosis dalam tiap kelompok. Dikatakan berbeda bermakna jika nilai kemaknaan $p < 0.05$.
- b. Jika hasil data tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis. Dikatakan berbeda bermakna jika nilai kemaknaan $p < 0.05$.

3.12. Etik penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan Pembebasan Etik No. 204/UN6.KEP/EC/2023 (Lampiran 3).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

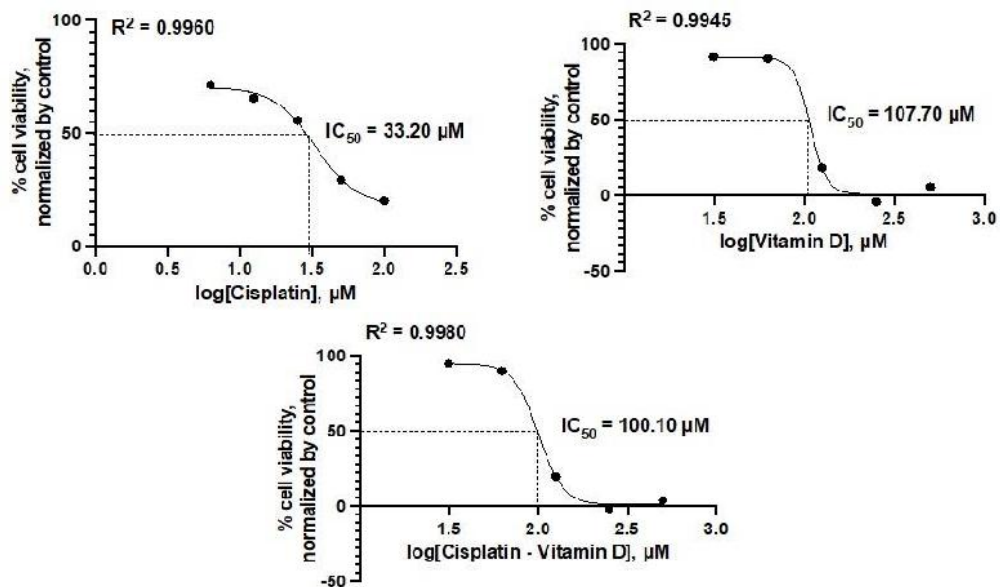
4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Penentuan IC50 Calcitriol, Cisplatin dan kombinasi Calcitriol-Cisplatin

Berdasarkan hasil dari penelitian sebelumnya, telah didapatkan IC50 dari calcitriol, cisplatin dan kombinasi calcitriol-cisplatin (Tabel 8). Hasil morfologi dari tiap kelompok dapat dilihat pada Lampiran 4. Gambar 20 menunjukkan kelompok calcitriol, IC50 ditetapkan sebesar 107.70 μM (44.87 ppm), pada kelompok cisplatin IC50 sebesar 33.20 μM (9.99 ppm) dan pada kelompok kombinasi calcitriol-cisplatin IC50 sebesar 100.10 μM (36.91 ppm).

Tabel 8. Konsentrasi dan rerata persentasi *cell survival* dari kelompok cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin-calcitriol.

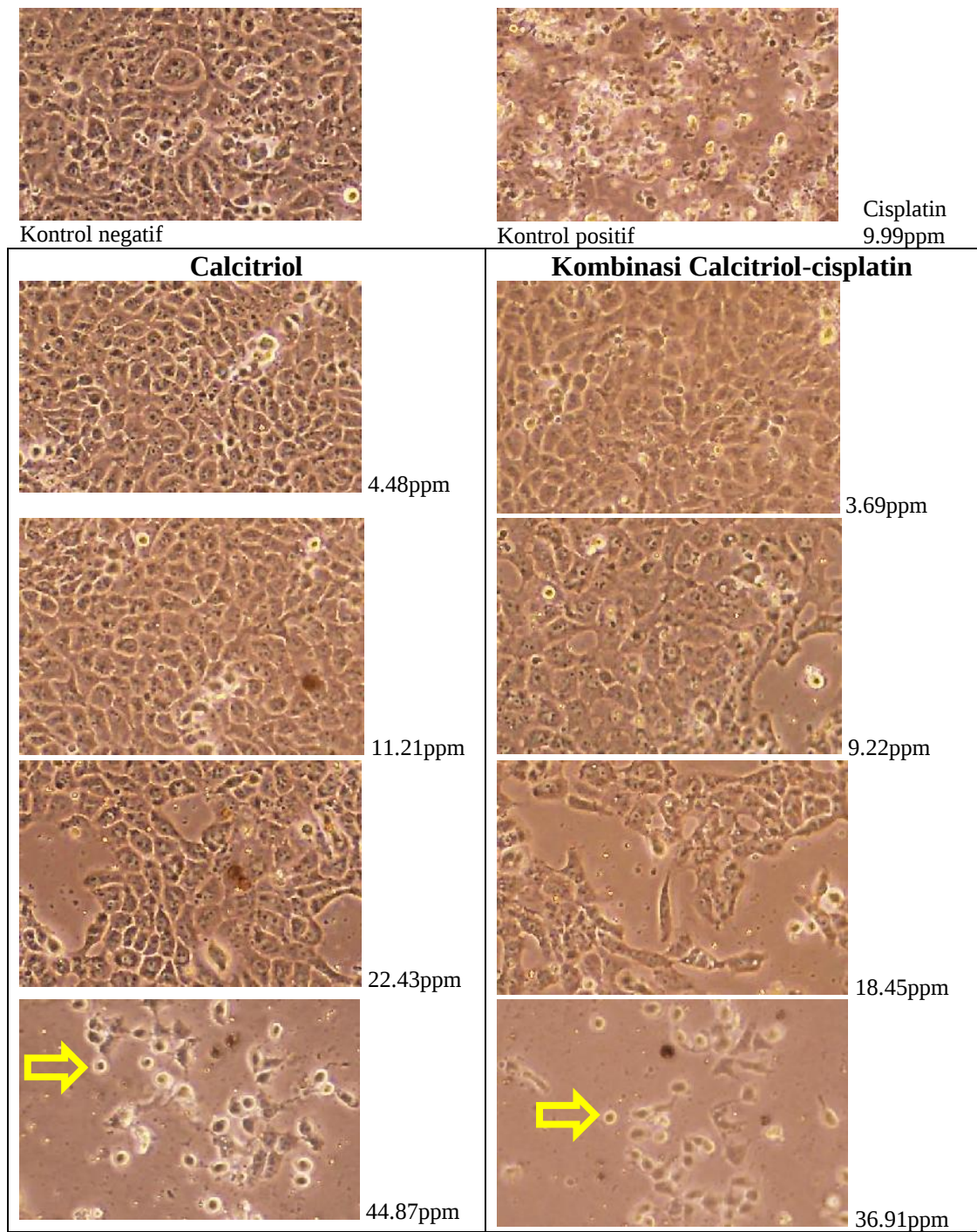
Cisplatin			Calcitriol			Kombinasi Cisplatin-Calcitriol		
		Mean % <i>cell survival</i>			Mean % <i>cell survival</i>			Mean % <i>cell survival</i>
Media		102.14	Media		102.14	Media		102.14
Pelarut		100.00	Pelarut		100.00	Pelarut		100.00
Konsentrasi (ppm)	Log 10 Konsentrasi (ppm)		Konsentrasi (ppm)	Log 10 Konsentrasi (ppm)		Konsentrasi (ppm)	Log 10 Konsentrasi (ppm)	
0.781	-0.107	100.26	3.906	0.592	90.86	3.90625	0.592	96.38
1.563	0.194	88.55	7.813	0.893	89.62	7.8125	0.893	94.48
3.125	0.495	88.07	15.625	1.194	87.72	15.625	1.194	88.79
6.250	0.796	71.50	31.250	1.495	91.79	31.25	1.495	95.10
12.500	1.097	65.58	62.500	1.796	90.67	62.5	1.796	90.07
25.000	1.398	55.74	125.000	2.097	18.62	125	2.097	19.93
50.000	1.699	29.30	250.000	2.398	-4.10	250	2.398	-1.69
100.000	2.000	20.20	500.000	2.699	5.67	500	2.699	3.96



Gambar 20. *Inhibitory concentration* (IC) 50 dari kelompok cisplatin (A), calcitriol (B) dan kombinasi calcitriol-cisplatin.

4.1.2. Perbenihan sel CAL27 pada tiap kelompok perlakuan

Perbenihan pada kelompok calcitriol, cisplatin dan kombinasi calcitriol-cisplatin dilakukan selama 48 jam. Kelompok calcitriol terdiri dari calcitriol dosis 1/10 IC₅₀ (4.48 ppm), 1/4 IC₅₀ (11.21 ppm), 1/2 IC₅₀ (22.43 ppm) dan 1x IC₅₀ (44.87 ppm). Kelompok kombinasi calcitriol dan cisplatin terdiri dari dosis 1/10 IC₅₀ (3.69 ppm), 1/4 IC₅₀ (9.22 ppm), 1/2 IC₅₀ (18.45 ppm) dan 1x IC₅₀ (36.91 ppm). Gambar 21 menunjukkan morfologi sel dari tiap kelompok, nampak sel yang mengalami kematian akan lebih menunjukkan gambaran membran sel yang bulat dengan inti yang hiperkromatik.



Gambar 21. Morfologi pada tiap kelompok perlakuan. Cisplatin (kontrol positif). Tanda panah (kuning) menunjukkan karakteristik sel tumor yang mengalami kematian sel.

4.1.3. Ekspresi mRNA p38 α MAP kinase

Pada Gambar 22, nampak ekspresi p38 α MAPK paling tinggi pada kelompok cisplatin (kontrol positif). Ekspresi akan sedikit menurun jika calcitriol tidak dikombinasikan dengan cisplatin, sedangkan kombinasi calcitriol dan cisplatin, akan meningkatkan ekspresi p38 α MAPK.

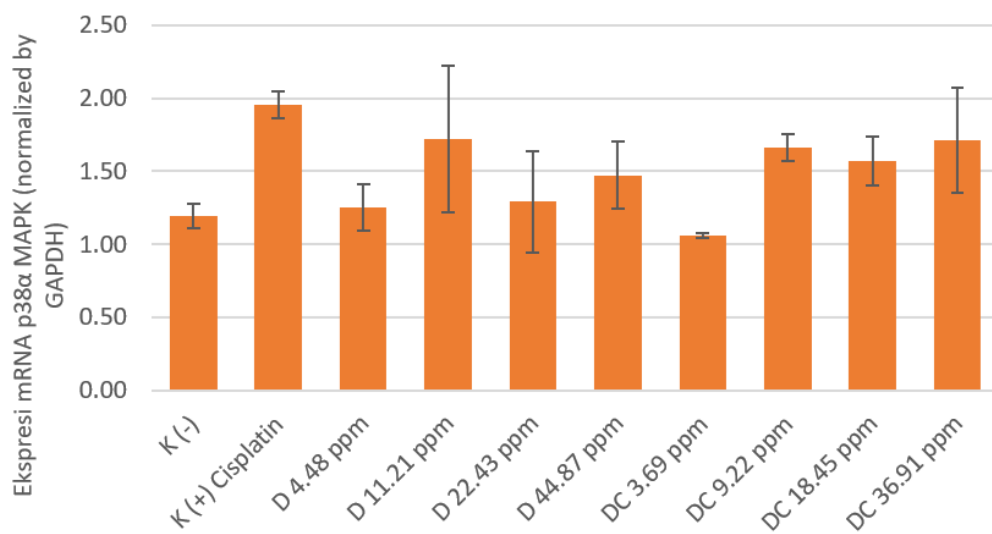
Berdasarkan hasil uji normalitas Shapiro-Wilk, nilai p38 α MAPK berdistribusi normal ($p=0.999$) (Lampiran 10). Selanjutnya analisis Anova dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan antara tiap kelompok perlakuan. Hasilnya tidak ditemukan perbedaan bermakna antara tiap kelompok perlakuan pada p38 α MAPK ($p=0.08$) (Tabel 9 dan Gambar 22).

Tabel 9. Uji ANOVA untuk ekspresi mRNA p38 α MAPK.

Kelompok	Ekspresi p38 α MAPK	SEM	F	<i>p</i> -value
Kontrol negatif (K-)	1.20	0.14	2.28	0.08
Cisplatin (K+)	1.96	0.17		
D 4.48 ppm	1.25	0.23		
D 11.21 ppm	1.72	0.03		
D 22.43 ppm	1.29	0.71		
D 44.87 ppm	1.47	0.13		
DC 3.69 ppm	1.06	0.50		
DC 9.22 ppm	1.66	0.24		
DC 18.45 ppm	1.57	0.33		
DC 36.91 ppm	1.71	0.51		

D calcitriol; DC cisplatin-calcitriol

* $p<0.05$



Gambar 22. Grafik ekspresi mRNA dari p38 α MAPK.

4.1.4. Ekspresi mRNA COX-2

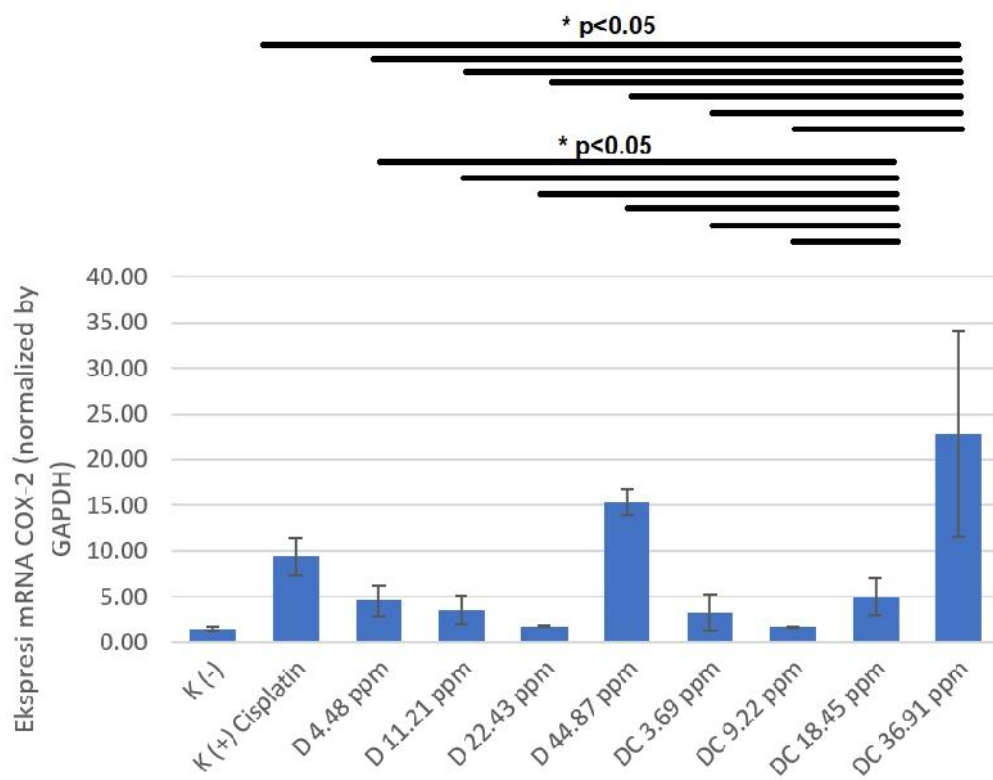
Pada Gambar 23, nampak pemberian calcitriol dapat meningkatkan ekspresi COX-2, terlebih lagi jika dikombinasikan dengan cisplatin. Dari uji distribusi Shapiro-Wilk, ditemukan nilai COX-2 berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 10). Hasil uji ANOVA ditemukan perbedaan bermakna antara tiap kelompok perlakuan ($p = 0.005$; $df = 9$) (Tabel 10). Dari uji post hoc (Gambar 23) ditemukan perbedaan bermakna antara kelompok DC 18.45ppm terhadap D 4.48ppm ($p = 0.040$), D 11.21ppm ($p = 0.024$), D 22.43ppm ($p = 0.026$), D 44.87ppm ($p = 0.012$), DC 3.69ppm ($p = 0.012$), dan DC 9.22ppm (0.048); antara kelompok DC 36.91ppm terhadap kontrol positif, D 4.48ppm ($p = 0.001$), D 11.21ppm ($p = 0.002$), D 22.43ppm ($p = 0.001$), D 44.87ppm ($p < 0.001$), DC 3.69ppm ($p < 0.001$), dan DC 9.22ppm ($p = 0.002$).

Tabel 10. Uji ANOVA untuk ekspresi mRNA COX-2.

Kelompok	Ekspresi COX-2	SEM	X ²	p-value
Kontrol negatif	1.45	0.32	4.70	0.005*
Cisplatin	9.38	3.44		
D 4.48 ppm	4.55	2.38		
D 11.21 ppm	3.48	2.91		
D 22.43 ppm	1.72	2.29		
D 44.87 ppm	15.36	0.05		
DC 3.69 ppm	3.26	0.08		
DC 9.22 ppm	1.61	2.77		
DC 18.45 ppm	5.01	2.03		
DC 36.91 ppm	22.81	15.92		

D calcitriol; DC cisplatin-calcitriol

* $p < 0.05$



Gambar 23. Grafik ekspresi mRNA dari COX-2. (* $p < 0.05$)

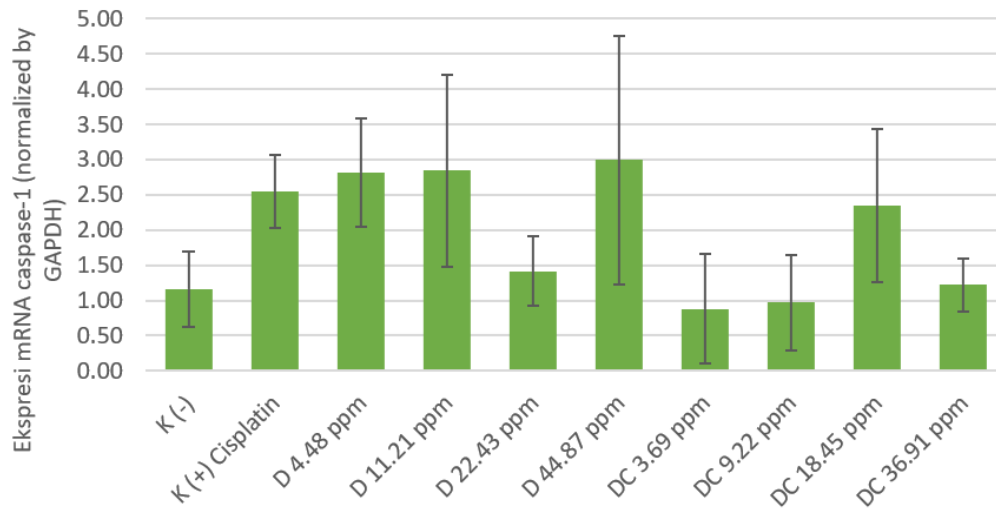
4.1.5. Ekspresi mRNA Caspase-1

Pada Gambar 24, nampak pemberian calcitriol meningkatkan ekspresi Caspase-1, tetapi pada kombinasi calcitriol dan cisplatin, nampak lebih rendah dibandingkan kelompok calcitriol dan kelompok cisplatin. Uji distribusi Shapiro-Wilk, ditemukan nilai Caspase-1 berdistribusi tidak normal ($p=0.016$) (Lampiran 10). Hasil uji Kruskal Wallis, tidak ditemukan perbedaan bermakna antara tiap kelompok perlakuan ($p=0.604$) (Tabel 11).

Tabel 11. Uji Kruskal-Wallis untuk ekspresi mRNA caspase-1.

Kelompok	Ekspresi Caspase-1	SEM	X^2	p -value
Kontrol negatif	1.16	0.54	7.322	0.604
Cisplatin	2.55	0.53		
D 4.48 ppm	2.81	0.77		
D 11.21 ppm	2.84	1.36		
D 22.43 ppm	1.42	0.49		
D 44.87 ppm	2.99	1.76		
DC 3.69 ppm	0.88	0.78		
DC 9.22 ppm	0.97	0.67		
DC 18.45 ppm	2.35	1.08		
DC 36.91 ppm	1.22	0.38		

D calcitriol; DC cisplatin-calcitriol



Gambar 24. Grafik ekspresi mRNA dari Caspase-1.

4.1.6. Ekspresi mRNA IL-1 β

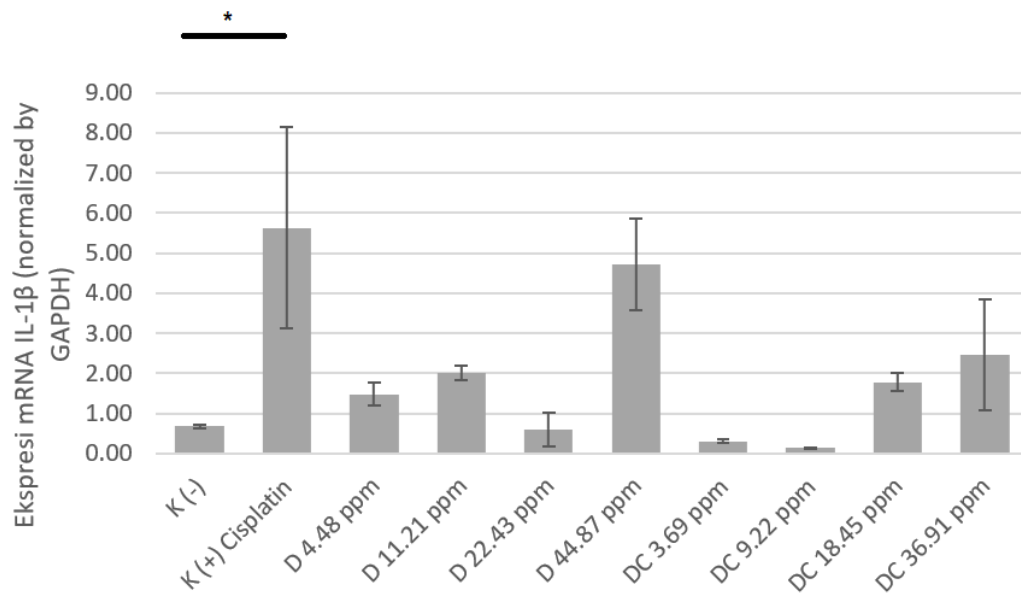
Pada Gambar 25, nampak pemberian calcitriol dapat menurunkan ekspresi IL-1 β pada kelompok kombinasi calcitriol-cisplatin hingga dua kali lipat dibandingkan kelompok calcitriol. Uji Shapiro-Wilk ditemukan nilai IL-1 β berdistribusi tidak normal ($p < 0.001$). Oleh karena tidak berdistribusi normal, maka uji antar kelompok digunakan Kruskal-Wallis, sehingga didapatkan ada perbedaan bermakna IL-1 β antara kelompok perlakuan ($p = 0.016$) (Tabel 12). Uji Mann Whitney ditemukan perbedaan ($p = 0.021$) hanya pada kelompok medium (kontrol negatif) dan cisplatin (kontrol positif).

Tabel 12. Uji Kruskal-Wallis untuk ekspresi mRNA IL-1 β .

Kelompok	Ekspresi IL-1 β	SEM	X ²	p-value
Kontrol negatif	0.67	0.04	20.4	0.016*
Cisplatin	5.63	2.51		
D 4.48 ppm	1.47	0.29		
D 11.21 ppm	2.00	0.17		
D 22.43 ppm	0.59	0.42		
D 44.87 ppm	4.72	1.14		
DC 3.69 ppm	0.30	0.05		
DC 9.22 ppm	0.13	0.02		
DC 18.45 ppm	1.78	0.23		
DC 36.91 ppm	2.45	1.38		

D calcitriol; DC cisplatin-calcitriol

* $p < 0.05$



Gambar 25. Grafik ekspresi mRNA dari IL-1 β . (* $p < 0.05$)

4.2. Pengujian Hipotesis

4.2.1. Hipotesis 1

4.2.1.1.Hipotesis: Terdapat perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAP kinase pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol.

4.2.1.2.Hasil yang menunjang hipotesis

Tidak ada.

4.2.1.3.Hasil yang tidak menunjang hipotesis.

Ekspresi mRNA p38 α MAP kinase tidak berbeda pada seluruh kelompok sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol (Gambar 22). Tetapi terdapat trend penurunan ekspresi p38 α MAP kinase pada kelompok calcitriol dibandingkan kelompok kombinasi calcitriol-cisplatin dan cisplatin (kontrol positif).

4.2.1.4.Simpulan: Hipotesis teruji dan ditolak

4.2.2. Hipotesis 2

4.2.2.1.Hipotesis: Terdapat perbedaan ekspresi mRNA COX-2 pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol.

4.2.2.2.Hasil yang menunjang hipotesis.

Ekspresi mRNA COX-2 signifikan berbeda bermakna pada sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-

calcitriol (Gambar 23). Melalui post-hoc, ditemukan adanya perbedaan antara kelompok kombinasi calcitriol-cisplatin 18.45ppm terhadap calcitriol (4.48ppm, 11.21ppm, 22.43ppm, 44.87ppm) dan kombinasi cisplatin-calcitriol (3.69ppm dan 9.22ppm); kelompok cisplatin-calcitriol 36.91ppm terhadap cisplatin (kontrol positif), calcitriol (4.48ppm, 11.21ppm, 22.43ppm, 44.87ppm) dan kombinasi cisplatin-calcitriol (3.69ppm dan 9.22ppm).

4.2.2.3. Hasil yang tidak menunjang hipotesis

Tidak ada.

4.2.2.4. Simpulan: Hipotesis teruji dan diterima.

4.2.3. Hipotesis 3

4.2.3.1. Hipotesis: Terdapat perbedaan ekspresi mRNA Caspase-1 pada sel

CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol.

4.2.3.2. Hasil yang menunjang hipotesis

Tidak ada.

4.2.3.3. Hasil yang tidak menunjang hipotesis.

Ekspresi mRNA Caspase-1 tidak berbeda pada seluruh kelompok sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol (Gambar 24). Pada kelompok calcitriol, terlihat lebih tinggi ekspresi caspase-1 pada sel CAL27 dibandingkan kelompok cisplatin (kontrol positif), dan kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol.

4.2.3.4.Simpulan: Hipotesis teruji dan ditolak.

4.2.4. Hipotesis 4

4.2.4.1.Hipotesis: Terdapat perbedaan ekspresi mRNA IL-1 β pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol.

4.2.4.2.Hasil yang menunjang hipotesis

Tidak ada.

4.2.4.3.Hasil yang tidak menunjang hipotesis.

Ekspresi mRNA IL-1 β tidak berbeda pada seluruh kelompok sel CAL27 yang diberikan perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol (Gambar 25). Perbedaan hanya ditemukan pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif (cisplatin) ($p < 0.05$). Ekspresi IL-1 β pada kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol nampak lebih rendah dua kali lipat dibandingkan kelompok cisplatin (kontrol positif).

4.2.4.4.Simpulan: Hipotesis teruji dan ditolak.

4.3. Pembahasan

4.3.1. p38 α MAPK

Pada penelitian ini, tidak ada perbedaan antara kelompok calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin dan calcitriol ($p = 0.08$) (Gambar 22). Hal ini menunjukkan bahwa calcitriol yang diberikan secara tunggal maupun dikombinasikan dengan cisplatin, menunjukkan ekspresi mRNA p38 α MAPK yang sama. p38 α ini

merupakan penanda biologis yang berperan penting dalam jalur MAPK, terutama dalam *cell-cycle arrest*, apoptosis, antiproliferatif dan survival.⁶³⁻⁶⁷ Ekspresi p38 α ini akan mengalami peningkatan pada proses inflamasi di KSS oral dibandingkan sel normal.¹³⁶ Hal ini mungkin dapat menjadi salah satu alasan mengapa pemberian calcitriol tunggal dapat meningkatkan ekspresi p38 α MAPK akibat adanya proses inflamasi. Hasil ini mendukung penelitian Weitsman dkk¹³⁷, bahwa pada kanker mammae, pemberian calcitriol dapat meningkatkan ekspresi p38 MAPK yang berlanjut pada kematian sel tumor. Ekspresi mRNA p38 α MAPK juga tidak berbeda antara perlakuan kelompok kombinasi cisplatin dan calcitriol dan cisplatin tunggal. Hal ini menunjukkan bahwa proses inflamasi yang disebabkan adanya cisplatin dan calcitriol juga dapat menyebabkan kematian sel. Hasil ini mendukung laporan dari Krishnan dan Feldman yang menunjukkan pada kanker prostat, terjadi proses inflamasi akibat adanya pemberian calcitriol tunggal.¹³⁸ Proses inflamasi ini nampaknya berperan dalam timbulnya kematian sel CAL27 KSS oral.

Jika dibandingkan antara kelompok calcitriol dan kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol, maka tidak nampak perbedaan ekspresi p38 α secara bermakna (Gambar 22). Hal ini menunjukkan bahwa p38 α MAPK berperan dalam proses proliferasi sel tumor, dan akan meningkat ekspresinya pada proses kematian sel tumor. Pada proliferasi sel tumor, p38 α MAPK akan mengaktifkan produksi sitokin dalam tumor microenvironment, sehingga sel kanker mampu bertahan terhadap stres onkogenik, radioterapi, kemoterapi ataupun terapi target lainnya.¹³⁹ Pada KSS oral, jika dilakukan penghambatan p38 α , maka sel tumor menjadi lebih sensitif terhadap kemoterapi cisplatin yang ditandai dengan adanya sel apoptotik. Marker p38 α

MAPK ini secara umum, dapat berperan pada proliferasi tumor dan kematian sel tumor. Pada kematian sel tumor, pemberian calcitriol dapat menghambat ekspresi p38 α MAPK dan menyebabkan peningkatan ROS pada sel tumor, sehingga menyebabkan kematian sel tumor yang mengalami inflamasi.^{37,112} Disamping itu, p38 α MAPK akan mengaktivasi kompleks inflamasom, yang akan memicu pembentukan pro-caspase-1 menjadi caspase-1.¹²⁴

Pada penelitian ini, pemberian calcitriol tunggal akan menyebabkan peningkatan apoptosis yang ditandai dengan adanya tren penurunan ekspresi p38 α pada sel CAL27 karsinoma sel skuamosa oral. Mekanisme apoptosis yang terjadi disebabkan karena calcitriol akan berikatan dengan VDR, menimbulkan penurunan ekspresi p38 α .¹¹² Hal ini juga dijumpai pada kanker mammae, aktivasi p38 akan menstimulasi VDR melalui c-Jun/AP-1 dan meningkatkan efek inhibisi terhadap proliferasi sel tumor.¹⁴⁰ Penghambatan p38 α akan menyebabkan gangguan homeostasis mitokondrial sehingga menimbulkan peningkatan ROS dan RNS. Selain itu, semakin meningkatnya jumlah ROS, maka akan semakin menghambat ekspresi p38 α melalui fosfatase MAPK.¹¹³

4.3.2. COX-2

Pada penelitian ini, ekspresi COX-2 berbeda bermakna antara kelompok calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol (Tabel 10). Ekspresi COX-2 ini diatur oleh NF- κ B bersama dengan p38 α .²⁷ COX-2 ini dapat memodulasi proliferasi dan apoptosis sel kanker. Pada sel kanker mammae, COX-2 berperan dalam timbulnya apoptosis sel kanker tersebut.^{128,141} Pemberian calcitriol dan

celecoxib akan menyebabkan penurunan ekspresi COX-2 sehingga menyebabkan apoptosis dari sel kultur kanker mammae.¹⁴¹ Menurut Liu dkk, ekspresi COX-2 akan menurun setelah pemberian calcitriol secara tunggal.¹⁰⁸ Ekspresi mRNA COX-2 akan meningkat setelah pemberian cisplatin, hal ini menunjukkan adanya proses inflamasi terkait cisplatin.

Calcitriol yang diberikan secara tunggal, dapat menekan proses inflamasi tersebut yang ditandai adanya penurunan mRNA COX-2 (konsentrasi 4.48 ppm, 11.21 ppm dan 22.43 ppm), tetapi pada konsentrasi 44.87 ppm terjadi peningkatan ekspresi mRNA COX-2, sehingga menyebabkan apoptosis optimal dari sel CAL27 (Gambar 23). Cisplatin yang dikombinasikan dengan calcitriol (konsentrasi 9.22 ppm) juga dapat menekan proses inflamasi, tetapi proliferasi sel CAL27 masih nampak nyata dibandingkan kombinasi cisplatin-calcitriol pada konsentrasi 36.91 ppm.

Pada penelitian ini, uji *post hoc* menunjukkan adanya perbedaan secara bermakna antara kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol 18.45 ppm terhadap calcitriol (4.48ppm, 11.21ppm, 22.43ppm, dan 44.87ppm), dan kombinasi cisplatin calcitriol (3.69ppm dan 9.22ppm). Kombinasi cisplatin dan calcitriol dapat meningkatkan ekspresi mRNA COX-2 lebih tinggi dibandingkan pemberian calcitriol secara tunggal. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan peran inflamasi akibat adanya cisplatin dan calcitriol. Pemberian calcitriol tunggal dapat memicu adanya proses inflamasi, namun jika dikombinasikan dengan cisplatin, maka proses inflamasi akan semakin meningkat tinggi sehingga menyebabkan kematian sel.

Pemberian kombinasi cisplatin-calcitriol (konsentrasi mampu menekan ekspresi mRNA COX-2 (Gambar 23). Jika dibandingkan pada laporan sebelumnya, ekspresi COX-2 akan menurun seiring dengan pemberian cisplatin pada kanker paru.¹⁴² Hal ini mungkin disebabkan karena derajat displasia dari sel CAL27 berdampak terhadap ekspresi COX-2. Menurut Wasilewicz dkk, adenoma derajat displasia berat menunjukkan ekspresi COX-2 lebih tinggi dibandingkan displasia ringan ($p < 0.001$).¹⁴³ Sel CAL27 yang berasal dari karsinoma sel skuamosa lidah diambil dari pasien 56 tahun di tahun 1982, tidak diketahui derajat displasiannya. Alasan lain ekspresi COX-2 yang meningkat, mungkin disebabkan karena adanya proses inflamasi pada sel tumor.

Peningkatan regulasi ekspresi COX-2 oleh akibat pemberian calcitriol, akan menyebabkan proses inflamasi yang memicu kematian sel CAL27. Hal ini mengindikasikan bahwa proses inflamasi berperan dalam apoptosis sel KSS oral. Mekanisme COX-2 yang mampu menghambat pertumbuhan tumor dan migrasi, melalui (a) regulasi dari *8-hydroxyoctanoic acid* dan (b) bersama $p38\alpha$ yang akan membentuk ROS.⁷³ Disamping peran ROS terhadap $p38\alpha$, ROS juga akan mengaktifasi TNFR1 dan TXNIP sehingga menyebabkan aktivasi NLRP3.^{116,117} NLRP3 *inflammasome* berperan dalam proses inflamasi dan respon imun untuk aktivasi caspase-1.¹¹⁸ Caspase-1 juga dapat dipengaruhi oleh aktivitas COX-2.¹⁴⁴

4.3.3. Caspase-1

Pada penelitian ini, tidak ada perbedaan bermakna ekspresi caspase-1 antara semua kelompok (Tabel 11), tetapi terlihat adanya trend peningkatan ekspresi pada

kelompok calcitriol dan penurunan ekspresi pada kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol. Hal ini menunjukkan bahwa proses kematian sel CAL27, lebih disebabkan adanya peran caspase-1 dalam proses inflamasi akibat paparan calcitriol. Kematian sel akibat adanya proses inflamasi disebut sebagai *pyroptosis*. Penurunan kadar caspase-1 ini juga ditemukan pada proses *pyroptosis* akibat paparan calcitriol pada *pancreatic ductal adenocarcinoma*¹⁴⁵, kanker mammae¹⁴⁶, dan kanker gaster¹⁴⁷.

Pada *pyroptosis*, proses kematian sel ini berbeda terhadap apoptosis.¹⁴⁸ Sel yang berperan untuk terjadinya *pyroptosis* ini adalah sel makrofag dan sel dendritik. Baik *pyroptosis* maupun apoptosis memerlukan jalur persinyalan dari caspase. Caspase-1 berperan penting dalam proses tersebut. Selama proses *pyroptosis*, terjadi kerusakan DNA, tetapi morfologi nukleus dari sel yang mengalami *pyroptosis* berbeda dengan sel yang mengalami apoptotik. Pada sel yang mengalami *pyroptosis*, nukleus mengalami kondensasi kromatin, bentuk nukleus tetap sama dan karyorhexis tidak terjadi.¹⁴⁸ Dalam mekanisme pembentukan caspase-1 ini, diawali adanya peran dari p38 α MAPK, yang akan mengaktivasi kompleks protein NLRP3/Caspase-1/ASC (disebut juga NLRP3 *inflammasome*; ASC atau PYCARD=*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) dan mengalami perubahan menjadi caspase-1 aktif yang akan mengubah pro-IL-1 β menjadi IL-1 β .^{124,149} Pada proses inflamasi ini, IL-1 β akan kembali mengaktivasi kompleks inflammasom, yang akan mengaktifkan kembali pro caspase-1 menjadi caspase-1. Siklus ini semakin meningkat seiring dengan proses inflamasi yang terjadi, sehingga menyebabkan kematian sel.

4.3.4. IL-1 β

Pada penelitian ini, ekspresi IL-1 β tidak berbeda bermakna antara kelompok calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitriol ($p>0.05$) (Tabel 12). Pemberian cisplatin pada sel tumor akan meningkatkan ekspresi mRNA IL-1 β .¹⁵⁰ Calcitriol diketahui mampu menurunkan ekspresi mRNA IL-1 β pada proses inflamasi yang menuju tumorigenesis

Nampak peningkatan ekspresi mRNA IL-1 β pada kelompok calcitriol dibandingkan kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol. Dengan adanya peningkatan ekspresi caspase-1 dan IL-1 β , menunjukkan bahwa proses inflamasi berperan pada kematian sel CAL27.⁸⁹ Menurut He dkk, ekspresi IL-1 β akan berdampak terhadap semakin tingginya ekspresi caspase-1.¹⁵¹ Sel makrofag yang teraktivasi, akan mengubah IL-1R1 menjadi IL-1 β dengan bantuan signal dari NF- κ B, sehingga membentuk kompleks *pyroptosom* yang akan menyebabkan kematian sel akibat caspase-1. Proses pyroptosis yang terjadi pada CAL27 perlu diteliti lebih lanjut agar pemberian terapi cisplatin yang dikombinasikan dengan calcitriol dapat disesuaikan dosisnya sehingga didapatkan efek kematian sel dan antiproliferatif yang maksimal pada karsinoma sel skuamosa oral.

Pada penelitian ini, pada kelompok kombinasi cisplatin-calcitriol ekspresi COX-2 nampak meningkat dan ekspresi IL-1 β nampak menurun. Menurut John, mediator inflamasi IL-1 β akan memodulasi Snail sehingga berdampak terhadap regulasi COX-2 dependent E-cadherin pada KSS leher dan kepala.¹⁵²

IL-1 β ini memiliki potensi pro- dan anti-tumor.¹⁵³ Ekspresi IL-1 β yang tinggi juga ditemukan pada berbagai jenis tumor.¹⁵³ Pada kondisi pro-tumor, IL-1 β akan mengaktivasi sel limfosit CD4 sehingga menghasilkan IL-17 yang akan menyebabkan angiogenesis dan proliferasi sel tumor.¹⁵³ Sedangkan pada kondisi anti-tumor, pemberian oxaliplatin akan menyebabkan kompleks NLRP3 sehingga memicu sekresi IL-1 β , yang selanjutnya akan mengaktifkan sel limfosit CD8 yang bekerja secara langsung terhadap sel tumor. Pada pemberian cisplatin di tumor nasofaring, IL-1 β bekerja secara langsung terhadap pertumbuhan tumor.¹⁵³ Sedangkan pada pemberian paclitaxel, IL-1 β menimbulkan dual effect, yaitu metastasis tumor dan supresi pertumbuhan tumor.¹⁵³

4.4.Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki keterbatasan dalam pengujian sampel. Sampel hanya diujikan sebanyak 2 kali untuk mendapatkan ekspresi penanda biologisnya. Meskipun pengulangan 2 kali masih dapat dianggap cukup dapat mewakili gambaran ekspresi penanda biologis, namun sebaiknya pengulangan dilakukan 3 kali agar didapatkan keakuratan data ekspresi gen tersebut.

Pemeriksaan protein interleukin tidak dilakukan dalam penelitian ini. Ekspresi mRNA dari IL-1 β yang didapatkan dari penelitian ini, mungkin perlu didukung oleh adanya pemeriksaan Western Blot untuk membuktikan kesesuaian antara ekspresi gen dan protein yang dihasilkan.

Perbedaan ekspresi penanda biologis yang didapatkan dalam penelitian ini, mungkin disebabkan karena sel kultur CAL27 yang menjadi subjek penelitian.

Informasi yang disediakan dalam ATCC sangat terbatas, tidak tersedianya data mengenai derajat displasia KSS lidah tersebut.¹⁵⁴ Sebaiknya digunakan sel kultur karsinoma sel skuamosa oral lain yang memiliki data pendukung dari mana sel tersebut berasal.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

5.1.1. Simpulan Umum

5.1.1.1. Tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA p38 α MAP kinase pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol ($p>0.05$).

5.1.1.2. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA COX-2 pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol ($p<0.05$).

5.1.1.3. Tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA Caspase-1 pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol ($p>0.05$).

5.1.1.4. Tidak terdapat perbedaan ekspresi mRNA IL-1 β pada sel CAL27 yang diberi perlakuan calcitriol, cisplatin dan kombinasi cisplatin-calcitrol ($p>0.05$).

5.1.2. Simpulan Khusus

5.1.2.1. Pemberian calcitriol pada karsinoma sel skuamosa oral dapat menyebabkan kematian sel melalui jalur inflamasi (*pyroptosis*) yang

ditandai dengan adanya ekspresi p38 α MAPK, COX-2, caspase-1 dan IL-1 β .

5.1.2.2. P38 α MAPK tidak dapat menjadi penanda biologis penentuan kematian sel CAL27 setelah pemberian terapi calcitriol, namun penanda biologis ini berperan untuk evaluasi efektivitas terapi menggunakan calcitriol dan cisplatin.

5.1.2.3. Ekspresi mRNA COX-2 nampak berbeda bermakna antara kombinasi cisplatin dan calcitriol konsentrasi 18.45 ppm dengan kelompok calcitriol (konsentrasi 4.48 ppm, 11.21 ppm, 22.43 ppm, 44.87 ppm) dan kelompok kombinasi cisplatin dan calcitriol (konsentrasi 3.69 ppm, dan 9.22 ppm).

5.1.2.4. Ekspresi mRNA COX-2 nampak berbeda bermakna antara kombinasi cisplatin dan calcitriol konsentrasi 36.91 ppm dengan kelompok kontrol positif (cisplatin), kelompok calcitriol (konsentrasi 4.48 ppm, 11.21 ppm, 22.43 ppm, 44.87 ppm) dan kelompok kombinasi cisplatin dan calcitriol (konsentrasi 3.69 ppm, dan 9.22 ppm).

5.2. Saran

5.2.1. Saran teoritis

5.2.1.1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak untuk penentuan mekanisme *autophagy* atau *pyroptosis* yang paling berperan dalam kematian sel pada karsinoma sel skuamosa mulut.

5.2.1.2.Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis konsentrasi terapi calcitriol yang adekuat sehingga didapatkan kematian sel tertinggi dari karsinoma sel skuamosa mulut. Hal ini terkait potensi calcitriol sebagai anti-proliferasi dan apoptosis dari sel tumor.

5.2.1.3.Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui penanda biologis lain yang berperan dalam jalur kematian akibat inflamasi pada sel tumor.

5.2.2. Saran praktis

5.2.2.1.Diharapkan pemberian terapi cisplatin dapat dikombinasikan dengan calcitriol sehingga dosis cisplatin yang digunakan dapat dikurangi namun tetap mendapatkan efek kematian sel dan antiproliferatif yang tinggi pada karsinoma sel skuamosa oral.

5.2.2.2.Diharapkan jalur kematian sel terkait inflamasi ini dapat diteliti lebih lanjut, agar pemberian terapi untuk karsinoma sel skuamosa dapat lebih akurat dan adekuat.

5.2.2.3.Diharapkan dengan asupan vitamin D, mampu menekan risiko perubahan sel normal menjadi karsinoma sel skuamosa oral di masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

1. WCRF. Mouth and oral cancer statistics . 2020. Available from: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/mouth-and-oral-cancer-statistics/>
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* . 2009 Apr;45(4–5):309–16.
3. Siakholak FR, Ghoncheh M, Pakzad R, Gandomani HS, Ghorat F, Salehiniya H. Epidemiology, incidence and mortality of oral cavity and lips cancer and their relationship with the human development index in the world. *Biomedical Research and Therapy* 2016 3:10 . 2016 Oct 29;3(10):1–17.
4. Borse V, Konwar AN, Buragohain P. Oral cancer diagnosis and perspectives in India. *Sensors International* . 2020 Jan 1;1:100046.
5. Sirait AM. Risk factors of oral and oropharyngeal cancers in Indonesia (Indonesia Basic Health Research 2007). *Media Litbangkes*. 2013 Sep;23(3):122129.
6. Cheong SC, Vatanasapt P, Yi-Hsin Y, Zain RB, Kerr AR, Johnson NW. Oral cancer in South East Asia. *Translational Research in Oral Oncology* . 2017 Jan;2(1):2057178X1770292.
7. Zakiullah, Ahmadullah, Khisroon M, Saeed M, Khan A, Khuda F, et al. Genetic susceptibility to oral cancer due to combined effects of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 gene variants in tobacco addicted patients of pashtun ethnicity of Khyber Pakhtunkhwa Province of Pakistan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(3):1145–50.

8. Gilligan G, Piemonte E, Lazos J, Simancas MC, Panico R, Warnakulasuriya S. Oral squamous cell carcinoma arising from chronic traumatic ulcers. *Clin Oral Investig*. 2022;27(1):193–201.
9. Verma A, Vincent-Chong VK, DeJong H, Hershberger PA, Seshadri M. Impact of Dietary Vitamin D on Initiation and Progression of Oral Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* . 2020 May 1;199:105603.
10. Huang Z, Zhang Y, Li H, Zhou Y, Zhang Q, Chen R, et al. Vitamin D promotes the cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma by inhibiting LCN2-modulated NF- κ B pathway activation through RPS3. *Cell Death Dis* . 2019 Dec 1;10(12).
11. Sutedja EK, Amarassaphira D, Goenawan H, Susanti Pratiwi Y, Sylviana N, Setiabudiawan B, et al. Calcitriol Inhibits Proliferation and Potentially Induces Apoptosis in B16-F10 Cells. *Med Sci Monit Basic Res* . 2022 May 5;28:e935139.
12. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2007 7:9 . 2007 Sep;7(9):684–700.
13. Cheng Y, Li S, Gao L, Zhi K, Ren W. The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* . 2021 Oct 22;11.
14. Jiang L, Ji N, Zhou Y, Li J, Liu X, Wang Z, et al. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncol* . 2009 Nov;45(11).

15. Simons AL, Fath MA, Mattson DM, Smith BJ, Walsh SA, Graham MM, et al. Enhanced response of human head and neck cancer xenograft tumors to cisplatin combined with 2-deoxy-D-glucose correlates with increased ¹⁸F-FDG uptake as determined by PET imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* . 2007 Nov 15;69(4):1222–30.
16. Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Serpico R, Fanali S, et al. p120cat delocalization in cell lines of oral cancer. *Oral Oncol* . 2002;38(1):64–72.
17. Tseng MY, Liu SY, Chen HR, Wu YJ, Chiu CC, Chan PT, et al. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 promotes oral cancer cell motility and is over-expressed in invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* . 2009 Sep;45(9):771–6.
18. Simoens C, Korst AEC, De Pooler CMJ, Lambrechts HAJ, Pattyn GGO, Faircloth GT, et al. In vitro interaction between ecteinascidin 743 (ET-743) and radiation, in relation to its cell cycle effects. *Br J Cancer* . 2003 Dec;89(12):2305–11.
19. He S, Zhang W, Li X, Wang J, Chen X, Chen Y, et al. Oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived exosomal MiR-221 targets and regulates phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) to promote human umbilical vein endothelial cells migration and tube formation. *Bioengineered*. 2021;12(1):2164–74.
20. Yang Y, Chen D, Liu H, Yang K. Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell

apoptosis via the AKT/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis* . 2019;10(2).

21. Peng Q, Deng Z, Pan H, Gu L, Liu O, Tang Z. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer. *Oncol Lett* . 2018 Feb 1;15(2):1379.
22. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* . 2014 Nov 15;120(22):3446–56.
23. García-Hernández L, García-Ortega MB, Ruiz-Alcalá G, Carrillo E, Marchal JA, García MÁ. The p38 MAPK Components and Modulators as Biomarkers and Molecular Targets in Cancer. *Int J Mol Sci* . 2022 Dec 29;23(1):370.
24. Niklander SE. Inflammatory Mediators in Oral Cancer: Pathogenic Mechanisms and Diagnostic Potential. *Frontiers in Oral Health* . 2021 Feb 22;2:642238.
25. Reddy ST, Herschman HR. Ligand-induced Prostaglandin Synthesis Requires Expression of the TISLOPGS-2 Prostaglandin Synthase Gene in Murine Fibroblasts and Macrophages. *The Journal of Biological Chemist*. 1994;22(3):15473–80.
26. Cho NP, Han HS, Leem DH, Choi IS, Jung JY, Kim HJ, et al. Sulforaphane enhances caspase-dependent apoptosis through inhibition of cyclooxygenase-2 expression in human oral squamous carcinoma cells and nude mouse xenograft model. *Oral Oncol* . 2009 Aug;45(8):654–60.

27. Singer CA, Baker KJ, McCaffrey A, AuCoin DP, Dechert MA, Gerthoffer WT. p38 MAPK and NF-kappaB mediate COX-2 expression in human airway myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* . 2003;285(5).
28. Lee DW, Park SW, Park SY, Heo DS, Kim KH, Sung MW. Effects of p53 or p27 overexpression on cyclooxygenase-2 gene expression in head, and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck*. 2004 Aug;26(8):706–15.
29. Joanna B, Jolanta B, Agnieszka G, Diana HZ, Krystyna S. Vitamin D, linoleic acid, arachidonic acid and COX-2 in colorectal cancer patients in relation to disease stage, tumour localisation and disease progression. *Arab J Gastroenterol* . 2019 Sep 1;20(3):121–6.
30. Soung YH, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Song SY, Yoo NJ, et al. Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers. *Hum Pathol* . 2008 Jun;39(6):895–900.
31. Guo Y, Kyprianou N. Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res*. 1999 Mar;59(6):1366–71.
32. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2010 Dec 14;107(50):21635–40.
33. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* . 2015 Apr 4;22(4):526.

34. Niu Z, Shi Q, Zhang W, Shu Y, Yang N, Chen B, et al. Caspase-1 cleaves PPAR γ for potentiating the pro-tumor action of TAMs. *Nat Commun* . 2017 Dec 1;8(1).
35. Sun Y, Guo Y. Expression of Caspase-1 in breast cancer tissues and its effects on cell proliferation, apoptosis and invasion. *Oncol Lett* . 2018 May 1;15(5):6431.
36. Molla MD, Akalu Y, Geto Z, Dagneb B, Ayelign B, Shibabaw T. Role of Caspase-1 in the Pathogenesis of Inflammatory-Associated Chronic Noncommunicable Diseases. *J Inflamm Res* . 2020;13:749.
37. Setiawan I, Lesmana R, Goenawan H, Suardi D, Gatera VA, Abdullah R, et al. Calcitriol potentially alters HeLa cell viability via inhibition of autophagy. *J Cancer Res Ther* . 2022 Jul 1;18(4):1144–51.
38. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am* . 2015 Jul 1;24(3):491.
39. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA, Hemantha K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000* . 2011 Oct;57(1):19–37.
40. Wetzel SL, Wollenberg J. Oral Potentially Malignant Disorders. *Dent Clin North Am* . 2020 Jan 1;64(1):25–37.
41. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine* . 2007 Nov 1;36(10):575–80.

42. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*. 2018 Aug 28;9(1):3490.
43. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* . 2008 Jan;87(1):14–32.
44. Lippman SM, Sudbø J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol* . 2005;23(2):346–56.
45. Scully C, Porter S. ABC of oral health: Oral cancer. *BMJ : British Medical Journal* . 2000 Jul 7;321(7253):97.
46. Scully C, Porter S. Oral cancer. *Western Journal of Medicine* . 2001;174(5):348.
47. Ranganathan K, Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol* . 2019 Jan 1;23(1):19.
48. American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting. *Manual for Staging of Cancer*. Chicago: Springer; 1977.
49. Kurita H, Nakanishi Y, Nishizawa R, Xiao T, Kamata T, Koike T, et al. Impact of different surgical margin conditions on local recurrence of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* . 2010 Nov;46(11):814–7.
50. Olivier T, Haslam A, Prasad V. Anticancer Drugs Approved by the US Food and Drug Administration From 2009 to 2020 According to Their Mechanism of Action. *JAMA Netw Open* . 2021;4(12).
51. Huang SH, O’Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* . 2013 Mar 1;18(2):e233.

52. Lang K, Baur M, Held T, Shafie R El, Moratin J, Freudlsperger C, et al. Definitive Radiotherapy for Squamous Cell Carcinoma of The Oral Cavity: a Single-institution Experience. *Radiol Oncol* . 2021 Nov 19;55(4):467.
53. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* . 2013 Jan 15 ;513(1):1–13.
54. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* . 2008 Nov;65(22):3525–44.
55. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* . 2003 Dec;22(4):395–403.
56. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* . 2011 Mar;75(1):50–83.
57. So KY, Kim SH, Jung KT, Lee HY, Oh SH. MAPK/JNK1 activation protects cells against cadmium-induced autophagic cell death via differential regulation of catalase and heme oxygenase-1 in oral cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* . 2017 Oct 1;332:81–91.
58. Perego P, Cossa G, Zuco V, Zunino F. Modulation of cell sensitivity to antitumor agents by targeting survival pathways. *Biochem Pharmacol*. 2010 Nov 15;80(10):1459–65.
59. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* . 2007 Aug;1773(8):1358–75.

60. Wagner EF, Nebreda ÁR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* . 2009 Aug;9(8):537–49.
61. Dashti SR, Efimova T, Eckert RL. MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J Biol Chem* . 2001 Mar 16;276(11):8059–63.
62. Junttila MR, Ala-Aho R, Jokilehto T, Peltonen J, Kallajoki M, Grenman R, et al. p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* . 2007 Aug 9;26(36):5267–79.
63. Tan G, Niu J, Shi Y, Ouyang H, Wu ZH. NF-κB-dependent MicroRNA-125b Up-regulation Promotes Cell Survival by Targeting p38α upon Ultraviolet Radiation. *J Biol Chem* . 2012 Sep 9;287(39):33036.
64. Phong MS, Horn RD Van, Li S, Tucker-Kellogg G, Surana U, Ye XS. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Promotes Cell Survival in Response to DNA Damage but Is Not Required for the G2 DNA Damage Checkpoint in Human Cancer Cells. *Mol Cell Biol* . 2010 Aug;30(15):3816.
65. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* . 2007 Nov;7(11):834–46.
66. Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* . 2009;5(1):44–52.
67. Ambrosino C, Nebreda AR. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell* . 2001;93(1–2):47–51.

68. Qiang L, Wu C, Ming M, Viollet B, He YY. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem* . 2013 Jan 18;288(3):1603–11.
69. Chen Y, Miao ZH, Zhao WM, Ding J. The p53 pathway is synergized by p38 MAPK signaling to mediate 11,11'-dideoxyverticillin-induced G2/M arrest. *FEBS Lett*. 2005 Jul 4;579(17):3683–90.
70. Pua LJW, Mai CW, Chung FFL, Khoo ASB, Leong CO, Lim WM, et al. Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 20;23(3):1108.
71. Liu L, Rezvani HR, Back JH, Hosseini M, Tang X, Zhu Y, et al. Inhibition of p38 MAPK Signaling Augments Skin Tumorigenesis via NOX2 Driven ROS Generation. *PLoS One* . 2014 May 13;9(5):e97245.
72. Mendes RA, Carvalho JFC, Waal I van der. An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. *Oral Oncol* . 2009 Oct;45(10).
73. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol* . 2019 May 1;234(5):5683–99.
74. Chan G, Boyle J, Yang E, Zhang F, Sacks P, Shah J, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck - PubMed. *Cancer Res* . 1999;59(5):991–4.
75. Lee DW, Sung MW, Park SW, Seong WJ, Roh JL, Park B, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in human squamous cell carcinomas of the

- head and neck and inhibition of proliferation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anticancer Res.* 2022;22(4):2089–96.
76. Gong Z, Huang W, Wang B, Liang N, Long S, Li W, et al. Interplay between cyclooxygenase-2 and microRNAs in cancer (Review). *Mol Med Rep.* 2021 Mar 11;23(5):347.
 77. Frejborg E, Salo T, Salem A. Role of Cyclooxygenase-2 in Head and Neck Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 1;21(23):1–17.
 78. Eren E, Ozoren N. Caspase-1: Past and Future of this Major Player in Cell Death and Inflammation. *Eur J Biol.* 2020;79(1):51–61.
 79. Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, et al. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature.* 2004 May 6;429(6987):75–9.
 80. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle L Vande, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature.* 2011 Nov 3;479(7371):117–21.
 81. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1992;256(5053):97–100.
 82. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol.* 2018 Jun 1;28(6):475–93.
 83. Eckhart L, Declercq W, Ban J, Rendl M, Lengauer B, Mayer C, et al. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum

- formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol* . 2000;115(6):1148–51.
84. Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Caspase expression in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* . 2011 Aug;33(8):1191–8.
 85. Ona VO, Li M, Vonsattel JPG, John Andrews L, Khan SQ, Chung WM, et al. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* . 1999 May 20;399(6733):263–7.
 86. Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, et al. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* . 2000 Apr 14;288(5464):335–9.
 87. Luksch H, Romanowski MJ, Chara O, Tüngler V, Caffarena ER, Heymann MC, et al. Naturally occurring genetic variants of human caspase-1 differ considerably in structure and the ability to activate interleukin-1 β . *Hum Mutat* . 2013 Jan;34(1):122–31.
 88. Zhang J, Wirtz S. Does Pyroptosis Play a Role in Inflammasome-Related Disorders? *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 9;23(18):10453.
 89. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015 526:7575 . 2015 Sep 16;526(7575):660–5.
 90. Monteleone M, Stow JL, Schroder K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* . 2015 Dec 3;74(2):213–8.

91. Chen X, Luo Q, Ding J, Yang M, Zhang R, Chen F, et al. Zymosan promotes proliferation, *Candida albicans* adhesion and IL-1 β production of oral squamous cell carcinoma in vitro. *Infect Agent Cancer* . 2020 Jul 31;15(1).
92. Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 4;12(7):1791.
93. MacDonald HM. Contributions of sunlight and diet to vitamin D status. *Calcif Tissue Int* . 2013 Feb 1;92(2):163–76.
94. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, et al. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *Am J Public Health* . 2006 Feb;96(2):252.
95. Cayo AK, Yen TWF, Misustin SM, Wall K, Wilson SD, Evans DB, et al. Predicting the need for calcium and calcitriol supplementation after total thyroidectomy: Results of a prospective, randomized study. *Surgery* . 2012 Dec;152(6):1059.
96. Olmos-Ortiz A, Avila E, Durand-Carbajal M, Díaz L. Regulation of Calcitriol Biosynthesis and Activity: Focus on Gestational Vitamin D Deficiency and Adverse Pregnancy Outcomes. *Nutrients* . 2015 Jan 9;7(1):443.
97. Fanidi A, Muller DC, Midttun Ø, Ueland PM, Vollset SE, Relton C, et al. Circulating vitamin D in relation to cancer incidence and survival of the head and neck and oesophagus in the EPIC cohort. *Sci Rep* . 2016 Nov 4;6.

98. Gupta D, Vashi PG, Trukova K, Lis CG, Lammersfeld CA. Prevalence of serum vitamin D deficiency and insufficiency in cancer: Review of the epidemiological literature. *Exp Ther Med* . 2011;2(2):181–93.
99. Bothwell KD, Shaurova T, Merzianu M, Suresh A, Kuriakose MA, Johnson CS, et al. Impact of Short-term 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on the Chemopreventive Efficacy of Erlotinib against Oral Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* . 2015 Sep 1;8(9):765–76.
100. Meier JD, Enepekides DJ, Poirier B, Bradley CA, Albala JS, Farwell DG. Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* . 2007 Nov;133(11):1149–52.
101. Vincent-Chong VK, DeJong H, Attwood K, Hershberger PA, Seshadri M. Preclinical Prevention Trial of Calcitriol: Impact of Stage of Intervention and Duration of Treatment on Oral Carcinogenesis. *Neoplasia* . 2019 Apr 1;21(4):376–88.
102. Bhoora S, Punchoo R. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 9296 . 2020 Dec 6;21(23):9296.
103. Rossi AM, Capiati DA, Picotto G, Benassati S, Boland RL. MAPK inhibition by 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D3 in breast cancer cells. Evidence on the participation of the VDR and Src. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* . 2004 May;89–90(1–5):287–90.

104. Cordes T, Diesing D, Becker S, Diedrich K, Reichrath J, Friedrich M. Modulation of MAPK ERK1 and ERK2 in VDR-positive and -negative breast cancer cell lines - PubMed. *Anticancer Res* . 2006;26(4A):2749–53.
105. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by Vitamin D Reduces Interleukin-6 Production in Normal Prostate Cells via Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 5: Implications for Prostate Cancer Prevention by Vitamin D. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4516–24.
106. Suo Z, Liu Y, Li Y, Xu C, Liu Y, Gao M, et al. Calcitriol inhibits COX-1 and COX-2 expressions of renal vasculature in hypertension: Reactive oxygen species involved? *Clin Exp Hypertens* . 2021;43(1):91–100.
107. Friedrich M, Reichert K, Woeste A, Polack S, Fischer D, Hoellen F, et al. Effects of Combined Treatment with Vitamin D and COX2 Inhibitors on Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res* . 2018 Feb;38(2):1201–7.
108. Liu W, Zhang L, Xu HJ, Li Y, Hu CM, Yang JY, et al. The Anti-Inflammatory Effects of Vitamin D in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 13;19(9):2736.
109. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* . 1999;15:269–90.
110. Zemel MB, Sun X. Calcitriol and energy metabolism. *Nutr Rev* . 2008 Oct ;66(SUPPL.2):S139–46.
111. Doherty TA, Brydges SD, Hoffman HM. Autoinflammation: translating mechanism to therapy. *J Leukoc Biol*. 2011 Feb 17;90(1):37–47.

112. Guo Y, Xie X, Zhao Y, Zhou M, Yang Y, Zhang X. Calcitriol attenuates renal tubular epithelial cells apoptosis via inhibiting p38MAPK signaling in diabetic nephropathy. *Acta Diabetol* . 2020 Nov 1;57(11):1327–35.
113. Wang Y, Qi H, Liu Y, Duan C, Liu X, Xia T, et al. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics* . 2021 Mar 4 ;11(10):4839–57.
114. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules* . 2019 Nov 1;9(11):735.
115. Mcgettrick AF, O'Neill LAJ. NLRP3 and IL-1 β in macrophages as critical regulators of metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab* . 2013;15 Suppl 3(S3):19–25.
116. Ye X, Zuo D, Yu L, Zhang L, Tang J, Cui C, et al. ROS/TXNIP pathway contributes to thrombin induced NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* . 2017 Apr 1;485(2):499–505.
117. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology* 2009 11:2 . 2009 Dec 20;11(2):136–40.
118. Haneklaus M, O'Neill LAJ. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev* . 2015 May 1;265(1):53–62.

119. Kaimul AM, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med* . 2007 Sep 15;43(6):861–8.
120. Pan M, Zhang F, Qu K, Liu C, Zhang J. TXNIP: A Double-Edged Sword in Disease and Therapeutic Outlook. *Oxid Med Cell Longev* . 2022;2022.
121. Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, Yamauchi S, Saitoh M, Takeda K, et al. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol* . 2007 Dec;27(23):8152–63.
122. Lv ZM, Wang Q, Wan Q, Lin JG, Hu MS, Liu YX, et al. The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells. *PLoS One* . 2011;6(7).
123. Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxid Redox Signal* . 2012 Dec 15;17(12):1738–47.
124. Li D, Ren W, Jiang Z, Zhu L. Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury. *Mol Med Rep* . 2018 Nov 1;18(5):4399.
125. Norouzi S, Norouzi M, Amini M, Amanzadeh A, Nabiuni M, Irian S, et al. Two COX-2 inhibitors induce apoptosis in human erythroleukemia K562 cells by modulating NF- κ B and FHC pathways. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* . 2016 Jan 7;24(1).

126. Erekat NS. Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* . 2018 Dec 21;65–82.
127. Nesic O, Perez-Polo R, Xu GY, McAdoo D, High KW, Hulsebosch C, et al. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury. *J Neurotrauma* . 2001;18(9):947–56.
128. Diederich M, Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int J Cell Biol* . 2010;2010.
129. Grimm M, Cetindis M, Biegner T, Lehman M, Munz A, Teriete P, et al. Serum vitamin D levels of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and expression of vitamin D receptor in oral precancerous lesions and OSCC. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* . 2015;20(2):e188–95.
130. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* . 2014 Oct 10;740:364.
131. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol* . 2019 May 1 ;234(5):5683–99.
132. Shi Y, Qian J, Zhang Q, Hu Y, Sun D, Jiang L. Advanced glycation end products increased placental vascular permeability of human BeWo cells via RAGE/NF- κ B signaling pathway. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2020 Jul;250:93–100.
133. McCormick DL, Phillips JM, Horn TL, Johnson WD, Steele VE, Lubet RA. Overexpression of COX-2 in Rat Oral Cancers and Prevention of Oral

- Carcinogenesis in Rats by Selective and Non-Selective COX Inhibitors. *Cancer Prev Res (Phila)* . 2010 Jan;3(1):73.
134. Jiang Z, Yao L, Ma H, Xu P, Li Z, Guo M, et al. miRNA-214 Inhibits Cellular Proliferation and Migration in Glioma Cells Targeting Caspase 1 Involved in Pyroptosis. *Oncol Res* . 2017;25(6):1009.
 135. Lee CH, Chang JSM, Syu SH, Wong TS, Chan JYW, Tang YC, et al. IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. *J Cell Physiol* . 2015 Apr 1;230(4):875–84.
 136. Li Z, Liu F yu, Kirkwood KL. The p38/MKP-1 Signaling Axis in Oral Cancer: Impact of Tumor-associated Macrophages. *Oral Oncol* . 2020 Apr 1;103:104591.
 137. Weitsman GE, Ravid A, Liberman UA, Koren R. The role of p38 MAP kinase in the synergistic cytotoxic action of calcitriol and TNF- α in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89–90:361–4.
 138. Krishnan A V, Feldman D. Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Mar;17(1):R19–38.
 139. Gill K, Kumar R, Mohanti BK, Dey S. Assessment of p38 α in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): a potential blood protein marker of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical and Translational Oncology*. 2013 Nov 4;15(11):969–73.

140. Qi X, Pramanik R, Wang J, Schultz RM, Maitra RK, Han J, et al. The p38 and JNK pathways cooperate to trans-activate vitamin D receptor via c-Jun/AP-1 and sensitize human breast cancer cells to vitamin D(3)-induced growth inhibition. *J Biol Chem* . 2002 Jul 19;277(29):25884–92.
141. Friedrich M, Reichert K, Woeste A, Polack S, Fischer D, Hoellen F, et al. Effects of Combined Treatment with Vitamin D and COX2 Inhibitors on Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res* . 2018 Feb 1;38(2):1201–7.
142. Jiang GB, Fang HY, Tao DY, Chen XP, Cao FL. COX-2 potentiates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by promoting EMT in an AKT signaling pathway-dependent manner. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* . 2019;23(9):3838–46.
143. Wasilewicz MP, Kołodziej B, Bojułko T, Kaczmarczyk M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D. Expression of cyclooxygenase-2 in colonic polyps. *Pol Arch Med Wewn*. 2010;120(9):313–20.
144. Zeng L, Zhen Y, Chen Y, Zou L, Zhang Y, Hu F, et al. Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF- κ B/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells. *Int J Oncol* . 2014 Nov 1;45(5):1929–36.
145. Cui J, Zhou Z, Yang H, Jiao F, Li N, Gao Y, et al. MST1 Suppresses Pancreatic Cancer Progression via ROS-Induced Pyroptosis. *Mol Cancer Res* . 2019 Jun 1;17(6):1316–25.

146. Wu X, Mao X, Huang Y, Zhu Q, Guan J, Wu L. Detection of proteins associated with the pyroptosis signaling pathway in breast cancer tissues and their significance. *Int J Clin Exp Pathol* . 2020;13(6):1408.
147. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* . 2015 Oct 29;526(7575):666–71.
148. Miao EA, Rajan J V., Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*. 2011 Sep 26;243(1):206–14.
149. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity* . 2015 Jun 16;42(6):991–1004.
150. Wong J, Tran LT, Magun EA, Magun BE, Wood LJ. Production of IL-1 β by bone marrow-derived macrophages in response to chemotherapeutic drugs. *Cancer Biol Ther*. 2014 Oct 10;15(10):1395–403.
151. He X, Qian Y, Li Z, Fan EK, Li Y, Wu L, et al. TLR4-Upregulated IL-1 β and IL-1RI Promote Alveolar Macrophage Pyroptosis and Lung Inflammation through an Autocrine Mechanism. *Sci Rep* . 2016 Aug 16;6.
152. John MA. Inflammatory mediators drive metastasis and drug resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* . 2015 Mar 1;125 Suppl 3(S3):S1–11.
153. Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers (Basel)* . 2020 Jul 1;12(7):1–31.

154. Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* . 1988;24(9):1445–55.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Seminar Usulan Riset



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS PADJADJARAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Raya Sekeloa Kidul No. 38 Bandung, Jawa Barat 40132 Telp. (022) 2535120-2535811 Fax (022) 2535115 E-mail: koprodi.kedokteran@unpad.ac.id
Website: www.kedokteran.unpad.ac.id

Nomor : 688/UN6.C.6.3C/PK.03.03/2022
Lamp. : 1 (satu) berkas
Hal : Seminar Usulan Riset (SUR)
Mahasiswa Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
a.n. Indrayadi Gurnadi

31 Oktober 2022

Yth.

- | | |
|---|--|
| 1. Dr. Irma Suflawati, drg., SpPM(K), Ph.D | Ketua Promotor / Ketua Sidang |
| 2. Hanna, dr., M.Kes., AIFO., Ph.D. | Anggota Promotor |
| 3. Dr.Dewi Marhaeni Diah Herawati, drg., M.Si | Anggota Promotor |
| 4. Ronny Lesmana, dr., M.Kes., AIFO, Ph.D | Penguji |
| 5. Eko Fuji Aryanto, dr., M.KM., Ph.D. | Penguji |
| 6. Prof. Dr. Diah Savitri Emawati, drg., M.Si., Sp.PM (K) | Penguji (FK Gigi Universitas Airangga) |

Dengan ini kami mengundang sejawat untuk menguji Seminar Usulan Riset (SUR) mahasiswa Program Studi Doktor secara online:

Nama : Indrayadi Gurnadi
NPM : 130130180004

yang akan dilaksanakan pada :

Hari : Senin
Tanggal : 7 November 2022
Waktu : 09.00 - 11.00 WIB
Link zoom : <https://tinyurl.com/Zoom-SUR-IndrayadiGurnadi>
Meeting ID : 938 3010 7811
Passcode: 555655

Judul Usulan Riset :

"Analisis potensial mekanisme molekular dari 1,25-(OH)₂D₃ terhadap proliferasi dan apoptosis sel CAL27 melalui jalur persinyalan p38α MAPK, COX-2, Caspase-1 dan IL-1β"

Atas perhatian dan kesediaan serta kehadiran Sejawat tepat pada waktunya, kami ucapkan terima kasih.

Ketua Program Studi Doktor,



Prof. Dr. Meita Dhamayanti, dr., SpA(K), M.Kes
NIP. 1963051010871220001

Catatan :

- UU ITE No. 11 Tahun 2008 Pasal 5 Ayat 1 "Informasi Elektronik dan/atau Dokumen Elektronik dan/atau hasil cetaknya merupakan alat bukti yang sah.
- Dokumen ini telah diandatangani secara elektronik menggunakan sertifikat elektronik yang diterbitkan oleh BSSr



Lampiran 2. Permohonan Persetujuan Etik dari Ketua Program Studi Doktor FK Universitas Padjadjaran



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS PADJADJARAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Sekeloa No. 58 Bandung Telp. (022) 2032179, 2038114 & 2038115 Fax. (022) 2037923
Web site : www.fk.unpad.ac.id , Email : kaprodi.kedokteran.s3@unpad.ac.id

Nomor : 053/UN6.C.6.30/PT.00/2023 17 Januari 2023
Lampiran : 1 (satu) berkas
Hal : Permohonan Persetujuan Etik

Yth. Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Padjadjaran

Sehubungan dengan rencana penelitian yang akan dilaksanakan oleh :

Nama Peneliti : Indrayadi Gunardi, drg., Sp.PM
NPM : 130130180004
Program Studi/institusi : Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Judul : ANALISIS POTENSIAL MEKANISME MOLEKULAR 1,25-(OH)₂D₃ TERHADAP
PROLIFERASI DAN APOPTOSIS SEL CAL27 KARSINOMA SEL SKUAMOSA ORAL
MELALUI JALUR PERSINYALAN P38 α MAPK, COX-2, CASPASE-1 DAN IL-1 β

Pembimbing I / Peneliti lain : Dr. Irna Sufiawati, drg., Sp.PM (KI)
Pembimbing II / Peneliti lain : Hanna, dr., M.Kes., All O., Ph.D
Pembimbing III / Peneliti lain : Dr. Dewi Marhaeni Diah Herawati, drg., M.Si.

Maka bersama ini kami mengajukan permohonan persetujuan etik sebagai salah satu syarat agar penelitian tersebut dapat dilaksanakan.

Demikian, atas perhatian dan kerjasama yang baik, kami ucapkan terima kasih.



Ketua Program Studi Doktor,

Prof. Dr. Meita Dhamayanti, dr., Sp.A., Subsp.TKPS., M.Kes.
NIP. 196305191987122001

Lampiran 3. Persetujuan Komisi Etik FK Universitas Padjadjaran



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS PADJADJARAN
KOMITE ETIK PENELITIAN
RESEARCH ETHICS COMMITTEE
Jl. Prof. Eyckman No. 38 Bandung 40161
Telp. & Fax. 022-2536897 email: kep@unpad.ac.id, website: kep.unpad.ac.id

No. Reg.: 2301050051

PEMBEBASAN ETIK ETHICAL EXEMPTION

Nomor: 204/UN6.KEP/EC/2023

Komite Etik Penelitian Universitas Padjadjaran Bandung, dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subjek penelitian serta menjamin bahwa penelitian yang menggunakan formulir survei/registrasi/surveilans/epidemiologi/humaniora/sosial budaya/bahan Biologi Tersimpan/Sel Punca dan non klinis lainnya berjalan dengan memperhatikan implikasi etik, hukum, sosial dan non klinis lainnya yang berlaku, telah mengkaji dengan teliti proposal penelitian berjudul:

The Research Ethics Committee Universitas Padjadjaran Bandung, in order to protect the rights and welfare of the research subject, and to guaranty that the research using survey questionnaire/registry/surveillance/epidemiology/humaniora/social-cultural/archived biological materials/stem cell/other non clinical materials, will carried out according to ethical, legal, social implications and other applicable regulations, has been thoroughly reviewed the proposal entitled:

"ANALISIS POTENSIAL MEKANISME MOLEKULAR 1,25-(OH)₂D₃ TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS SEL CAL27 KARSINOMA SEL SKUAMOSA ORAL MELALUI JALUR PERSINYALAN P38A MAPK, COX-2, CASPASE-1 DAN IL-1B"

Nama Peneliti Utama <i>Principal Researcher</i>	:	Indrayadi Gunardi
Pembimbing/Peneliti Lain <i>Supervisor/Other Researcher</i>	:	Dr. Drg. Ina Sufiawati, SpPM. Hanna, dr. Dr. Dewi Marhaeni Diah Herawati, drg., M.Si
Nama Institusi <i>Institution</i>	:	Program Pascasarjana Program Studi Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

proposal tersebut dapat dibebaskan pelaksanaannya.
hereby declare that the proposal is exempted.



Ditetapkan di : Bandung
Issued in
Tanggal : 13-02-2023
Date



Ketua
Chairman,

Nur Atik, dr, M.Kes., PhD
NIP. 19811010 200801 1 019

Keterangan/notes:

Persetujuan etik ini berlaku selama satu tahun sejak tanggal ditetapkan.
This ethical clearance is effective for one year from the due date.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan ke Komite Etik Penelitian.

In the end of the research, progress and final summary report should be submitted to the Research Ethics Committee.

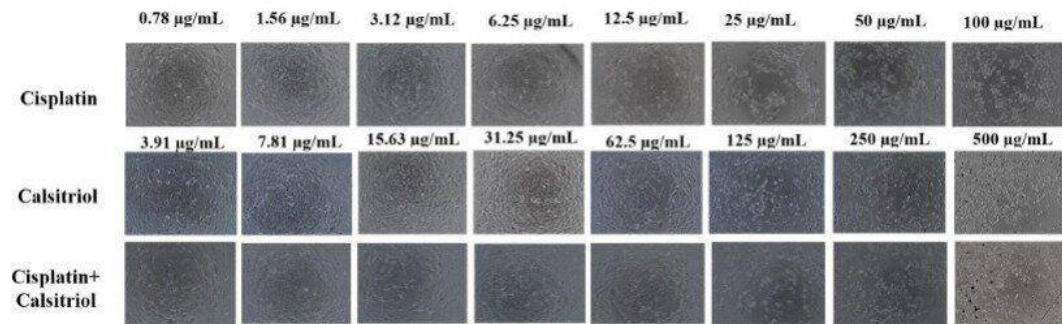
Jika ada perubahan atau penyimpangan protokol dan/atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian.

If there be any protocol modification or deviation and/or extension of the study, the Principal Investigator is required to resubmit the protocol for approval.

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD) harus segera dilaporkan ke Komite Etik Penelitian.

If there are Serious Adverse Events (SAE) should be immediately reported to the Research Ethics Committee

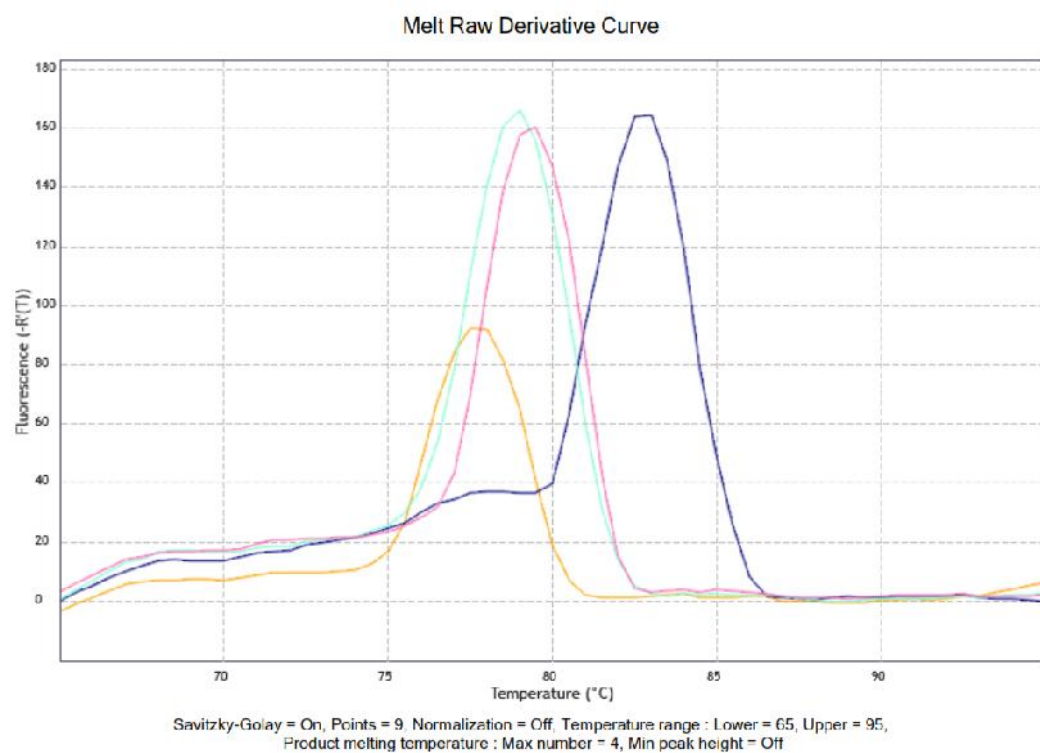
Lampiran 4. Hasil viabilitas sel CAL27 dalam menentukan IC50 dari cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin-calcitriol



Perubahan histologik sel CAL27 setelah diberikan paparan cisplatin, calcitriol dan kombinasi cisplatin-calcitriol dengan berbagai konsentrasi.

Lampiran 5. Optimasi suhu PCR

Sebelum melakukan PCR terhadap marker yang dituju, dilakukan optimasi suhu untuk PCR. Berdasarkan data sebelumnya, diketahui suhu 95°C. Gambar dibawah menunjukkan grafik optimasi untuk marker p38 α MAPK (kuning), COX-2 (biru tua), Caspase-1 (merah muda), dan IL-1 β (biru muda).



Lampiran 6. Hasil mRNA ekspresi p38 α MAPK

p38 α MAPK					
Sampel	dCT	ddCT	2 ⁻ DDCT	Ave	SEM
MD1(1)	5.83	0	1.00	1.13	0.13
MD1(2)	5.49	-0.34	1.27		
MD+C (1)	5.45	-0.38	1.30	1.26	0.04
MD+C (2)	5.54	-0.29	1.22		
CIS D1(1)	4.89	-0.94	1.92	2.06	0.14
CIS D1(2)	4.69	-1.14	2.20		
CIS D+C(1)	4.91	-0.92	1.89	1.85	0.04
CIS D+C(2)	4.97	-0.86	1.82		
1/10 D1(1)	5.7	-0.13	1.09	1.25	0.16
1/10 D1(2)	5.33	-0.5	1.41		
1/10 D+C(1)	5.71	-0.12	1.09	1.06	0.02
1/10 D+C(2)	5.77	-0.06	1.04		
1/4 D1(1)	4.68	-1.15	2.22	1.72	0.50
1/4 D1(2)	5.55	-0.28	1.21		
1/4 D+C(1)	5.02	-0.81	1.75	1.66	0.09
1/4 D+C(2)	5.18	-0.65	1.57		
1/2 D1(1)	5.92	0.09	0.94	1.29	0.35
1/2 D1(2)	5.11	-0.72	1.65		
1/2 D+C(1)	5.03	-0.8	1.74	1.57	0.17
1/2 D+C(2)	5.35	-0.48	1.39		
1D1 (1)	5.52	-0.31	1.24	1.47	0.23
1D1 (2)	5.06	-0.77	1.71		
1 D+C(1)	5.39	-0.44	1.36	1.71	0.36
1 D+C(2)	4.78	-1.05	2.07		

Lampiran 7. Hasil mRNA ekspresi COX-2

COX-2					
Sampel	dCT	ddCT	2 ⁻ ΔΔCT	Ave	SEM
MD1(1)	9.16	0	1.00	1.35	0.35
MD1(2)	8.39	-0.77	1.71		
MD+C (1)	9.37	-0.57	1.48	1.55	0.07
MD+C (2)	9.24	-0.7	1.62		
CIS D1(1)	7.2	-2.74	6.68	10.55	3.87
CIS D1(2)	6.09	-3.85	14.42		
CIS D+C(1)	6.86	-3.08	8.46	8.20	0.26
CIS D+C(2)	6.95	-2.99	7.94		
1/10 D1(1)	8.42	-1.52	2.87	4.55	1.68
1/10 D1(2)	7.3	-2.64	6.23		
1/10 D+C(1)	9.68	-0.26	1.20	3.26	2.06
1/10 D+C(2)	7.53	-2.41	5.31		
1/4 D1(1)	7.59	-2.35	5.10	3.48	1.62
1/4 D1(2)	9.04	-0.9	1.87		
1/4 D+C(1)	9.28	-0.66	1.58	1.61	0.03
1/4 D+C(2)	9.22	-0.72	1.65		
1/2 D1(1)	9.11	-0.83	1.78	1.72	0.06
1/2 D1(2)	9.21	-0.73	1.66		
1/2 D+C(1)	7.14	-2.8	6.96	5.01	1.96
1/2 D+C(2)	8.33	-1.61	3.05		
1D1 (1)	6.14	-3.8	13.93	15.36	1.43
1D1 (2)	5.87	-4.07	16.80		
1 D+C(1)	6.41	-3.53	11.55	22.81	11.25
1 D+C(2)	4.85	-5.09	34.06		

Lampiran 8. Hasil mRNA ekspresi Caspase-1

Caspase-1					
Sampel	dCT	ddCT	2 ⁻ DDCT	Ave	SEM
MD1(1)	5.66	-0.85	1.80	1.40	0.40
MD1(2)	6.51	0	1.00		
MD+C (1)	5.84	-0.67	1.59	0.91	0.68
MD+C (2)	8.58	2.07	0.24		
CIS D1(1)	6.16	-0.35	1.27	1.44	0.17
CIS D1(2)	5.82	-0.69	1.61		
CIS D+C(1)	4.33	-2.18	4.53	3.65	0.88
CIS D+C(2)	5.04	-1.47	2.77		
1/10 D1(1)	5.48	-1.03	2.04	2.81	0.77
1/10 D1(2)	4.67	-1.84	3.58		
1/10 D+C(1)	5.78	-0.73	1.66	0.88	0.78
1/10 D+C(2)	9.8	3.29	0.10		
1/4 D1(1)	4.44	-2.07	4.20	2.84	1.36
1/4 D1(2)	5.94	-0.57	1.48		
1/4 D+C(1)	5.79	-0.72	1.65	0.97	0.67
1/4 D+C(2)	8.26	1.75	0.30		
1/2 D1(1)	5.58	-0.93	1.91	1.42	0.49
1/2 D1(2)	6.62	0.11	0.93		
1/2 D+C(1)	4.73	-1.78	3.43	2.35	1.08
1/2 D+C(2)	6.17	-0.34	1.27		
1D1 (1)	6.21	-0.3	1.23	2.99	1.76
1D1 (2)	4.26	-2.25	4.76		
1 D+C(1)	5.83	-0.68	1.60	1.22	0.38
1 D+C(2)	6.76	0.25	0.84		

Lampiran 9. Hasil mRNA ekspresi IL-1 β

IL-1 β					
Sampel	dCT	ddCT	2 ⁻ DDCT	Ave	SEM
MD1(1)	3.56	0	1.00	1.04	0.04
MD1(2)	3.46	-0.1	1.07		
MD+C (1)	5.05	1.49	0.36	0.31	0.05
MD+C (2)	5.52	1.96	0.26		
CIS D1(1)	2.27	-1.29	2.45	6.69	4.24
CIS D1(2)	0.11	-3.45	10.93		
CIS D+C(1)	1.64	-1.92	3.78	4.57	0.78
CIS D+C(2)	1.14	-2.42	5.35		
1/10 D1(1)	3.32	-0.24	1.18	1.47	0.29
1/10 D1(2)	2.74	-0.82	1.77		
1/10 D+C(1)	5.08	1.52	0.35	0.30	0.05
1/10 D+C(2)	5.53	1.97	0.26		
1/4 D1(1)	2.69	-0.87	1.83	2.00	0.17
1/4 D1(2)	2.44	-1.12	2.17		
1/4 D+C(1)	6.66	3.1	0.12	0.13	0.02
1/4 D+C(2)	6.28	2.72	0.15		
1/2 D1(1)	6.08	2.52	0.17	0.59	0.42
1/2 D1(2)	3.55	-0.01	1.01		
1/2 D+C(1)	2.55	-1.01	2.01	1.78	0.23
1/2 D+C(2)	2.93	-0.63	1.55		
1D1 (1)	1.01	-2.55	5.86	4.72	1.14
1D1 (2)	1.72	-1.84	3.58		
1 D+C(1)	3.46	-0.1	1.07	2.45	1.38
1 D+C(2)	1.62	-1.94	3.84		

Lampiran 10. Hasil uji normalitas

Normality Tests			
		statistic	p
p38 α	Shapiro-Wilk	0.946	0.218
COX-2	Shapiro-Wilk	0.720	0.453
Caspase-1	Shapiro-Wilk	0.893	0.016
IL-1 β	Shapiro-Wilk	0.762	< .001

Note. Additional results provided by *moretests*

Nilai p38 α MAPK dan COX-2 memiliki distribusi normal ($p > 0.05$). Caspase-1 dan IL-1 β memiliki nilai distribusi tidak normal.

Lampiran 11. Hasil ANOVA untuk p38 α MAPK

One-Way ANOVA (Welch's)				
	F	df1	df2	p
p38	2.284	9	4.44	0.08

Pada uji ANOVA, nilai ekspresi mRNA p38 menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara tiap kelompok ($p = 0.08$).

Lampiran 12. Hasil ANOVA untuk COX-2

Tabel 2-2 :
ANOVA table

Source	SS	df	MS	F	p-value
Treatment	968.19640	9	107.577377	4.70	.0051
Error	320.34727	14	22.881948		
Total	1,288.54367	23			

Uji Post hoc untuk COX-2

	K-	D-4	DC-1	D-2	D-3	D-1	DC-2	K+	DC-3
	1.45	1.61	1.72	3.26	3.48	4.55	5.01	9.38	15.36
K-									
D-4	.9697								
DC-1	.9499	.9828							
D-2	.6701	.7364	.7526						
D-3	.6319	.7020	.7179	.9630					
D-1	.4671	.5491	.5632	.7906	.8265				
DC-2	.4052	.4895	.5028	.7196	.7543	.9251			
K+	.0345	.0820	.0858	.1618	.1768	.2636	.3097		
DC-3	.0047	.0123	.0128	.0240	.0263	.0403	.0482	.1704	
DC-4	.0001	.0006	.0006	.0011	.0012	.0019	.0023	.0059	.1420

Lampiran 13. Hasil Kruskal Wallis untuk caspase-1 dan IL-1 β .

Hasil Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis

	χ^2	df	p
Caspase-1	7.32	9	0.604
IL-1B	20.4	9	0.016

Uji Mann-Whitney untuk IL-1 β

	Kelompok (<i>p</i> -value)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.021*	0.064	0.24	0.064	0.064	0.643	0.064	0.064	0.1
2		0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	1	0.355
3			0.121	0.121	0.121	0.121	0.439	0.121	1
4				0.121	0.121	1	0.121	0.121	0.121
5					0.121	0.121	0.439	0.121	1
6						0.121	0.121	0.121	0.121
7							0.121	0.121	0.121
8								0.121	1
9									0.439