

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| DAFTAR ISI | iv |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| DAFTAR SINGKATAN | xiv |
| ABSTRAK..... | xvi |
| BAB I. PENDAHULUAN..... | 1 |
| A. Latar Belakang..... | 1 |
| B. Rumusan Masalah..... | 4 |
| C. Tujuan Penelitian | 5 |
| D. Manfaat Penelitian | 5 |
| E. Keaslian Penelitian & Kebaruan Penelitian..... | 6 |
| Tabel 1. Kebaruan Penelitian/ <i>Novelty</i> | 6 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 9 |
| A. Tinjauan Pustaka | 9 |
| 1. Kanker Penis | 9 |
| 2. Mikro RNA | 22 |
| 3. Metastasis | 27 |
| B. Kerangka Teori..... | 31 |
| C. Kerangka Konsep | 32 |
| D. Hipotesis Penelitian..... | 33 |
| BAB III. METODE PENELITIAN | 34 |
| A. Rancangan Penelitian | 34 |
| B. Populasi dan Subjek Penelitian | 34 |
| C. Lokasi dan Waktu Penelitian..... | 35 |
| D. Definisi Operasional Variabel Penelitian..... | 35 |
| E. Pengumpulan Data dan Alat Ukur..... | 36 |
| F. Analisis Data..... | 37 |
| 1. Analisis Tahap-1: Analisis <i>profiling</i> miRNA | 38 |

| | |
|--|-----|
| 2. Analisis Tahap-2: Bioinformatika: | 44 |
| G.Etika Penelitian | 45 |
| H.Tahapan Pelaksanaan Penelitian | 46 |
| I.Rencana Kerja..... | 48 |
| J.Sumber Daya | 49 |
| K.Rencana Publikasi | 49 |
| BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | 50 |
| A.Hasil Penelitian | 50 |
| 1. Karakteristik Pasien KSSP | 53 |
| 2. Identifikasi signifikan miRNA pada tumor primer KSSP dibandingkan dengan jaringan penis normal | 54 |
| 3. Identifikasi signifikan miRNA pada tumor metastasis ke KGB KSSP dibandingkan dengan jaringan penis normal | 59 |
| 4. Identifikasi signifikan miRNA pada tumor primer KSSP dibandingkan dengan tumor metastasis ke KGB..... | 62 |
| 5. Gen target miRNA tervalidasi yang paling banyak ditarget beserta <i>enrichment analysis</i> | 66 |
| 6. <i>Novelty</i> miRNA..... | 71 |
| B. Pembahasan | 126 |
| 1. Ekspresi miR-31-5p | 129 |
| 2. Ekspresi miR-4286 | 134 |
| 3. Ekspresi miR-135b-5p | 136 |
| 4. Ekspresi miR-155b-5p | 140 |
| 5. Ekspresi miR-1-3p | 144 |
| BAB V KESIMPULAN dan SARAN | 149 |
| A.Kesimpulan | 149 |
| B.Saran | 150 |
| C.Ringkasan | 150 |
| Daftar Pustaka..... | 165 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 1. Ekspresi onkoprotein E6 dan E7 HPV pada proses karsinogenesis. ... | 13 |
| Gambar 2. <i>Inflammatory microenvironment in cancer development</i> | 15 |
| Gambar 3. Diagram skema yang menggambarkan kaskade sitokin terkendali miRNA pada peradangan terkait inflamasi..... | 16 |
| Gambar 4. Terganggunya epigenetik pada proses inflamasi (Murata, 2018)..... | 18 |
| Gambar 5. Peranan TGF- β pada immunitas anti-tumor | 19 |
| Gambar 6. Rangsangan proses inflamasi kronis pada sel. Aktivasi sejumlah jalur NF- κ B, MAPK, STAT, p53, PI3K/mTOR, CREB dan Wnt/B-catenin | 20 |
| Gambar 7. Biogenesis miRNA (Rupaimoole and Slack, 2017) | 24 |
| Gambar 8. Skema ilustrasi biogenesis miRNA dan ekstra seluler vesikel miRNA transfer | 25 |
| Gambar 9. Kaskade Metastasis. Lima langkah metastasis antara lain: invasi, intravasasi, sirkulasi, ekstrasvasasi, dan kolonisasi. | 28 |
| Gambar 11. Peran eksosom sel tumor dan stroma dalam proses metastasis sel kanker. | 30 |
| Gambar 12. Kerangka Teori | 31 |
| Gambar 13. Kerangka Konsep..... | 32 |
| Gambar 14. Parameter filter volcano plot..... | 41 |
| Gambar 15. Volcano Plot | 41 |
| Gambar 16. Heat Map..... | 42 |
| Gambar 17. <i>Pipeline</i> | 47 |
| Gambar 16. <i>Field of view</i> sampel penelitian..... | 51 |
| Gambar 18. <i>Binding density</i> sampel penelitian | 52 |
| Gambar 19. <i>Positive control linearity</i> sampel penelitian | 53 |
| Gambar 20. <i>Heat Map</i> tumor primer dibandingkan dengan jaringan penis normal. | 55 |
| Gambar 21. Volcano plot tumor primer dibandingkan dengan jaringan penis normal. | 58 |
| Gambar 22. Heat Map tumor metastasis dibandingkan dengan jaringan penis normal. | 59 |

| | |
|---|----|
| Gambar 23. Volcano plot tumor metastatis dibandingkan dengan jaringan penis normal. | 62 |
| Gambar 24. Analisis Venn DEM pada tumor primer dan tumor metastasis. | 63 |
| Gambar 25. Top 5 <i>Up-regulated</i> miRNA pada tumor primer dan tumor metastasis KSSP. | 64 |
| Gambar 26. Top 4 <i>down-regulated</i> miRNA pada tumor primer dan tumor metastasis KSSP. | 65 |
| Gambar 27. <i>Functional analysis</i> of 100 <i>validated targeted genes</i> of DEMs pada tumor primer KSSP. | 69 |
| Gambar 28. <i>Functional analysis</i> dari 100 <i>validated targeted genes</i> dari signifikan <i>dysregulated</i> miRNA pada tumor metastasis KGB KSSP. | 71 |
| Gambar 29. Nilai <i>average reads count</i> miR-31-5p dari jaringan normal, tumor primer, dan tumor metastasis KSSP. | 72 |
| Gambar 30. Nilai <i>reads count</i> miR-31-5p pada tumor primer. Nilai RC terendah pada pasien yang masih hidup (warna hijau) meningkat pada pasien dengan yang telah meninggal (warna merah). | 72 |
| Gambar 31. Nilai <i>reads count</i> miR-31-5p pada tumor metastasis. | 73 |
| Gambar 32. Ekspresi miR-31-5p menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor primer KSSP dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 74 |
| Gambar 33. Ekspresi miR-31-5p menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor metastasis KSSP dibandingkan dengan jaringan penis normal (<i>non-tumor</i>) ($p<0,01$). | 74 |
| Gambar 34. KEGG <i>pathways</i> dari 60 gen target miR-31-5p menampilkan 10 <i>patways</i> terkuat ($FDR<0,01$). | 76 |
| Gambar 35. A. <i>Functional analysis</i> 60 gen tervalidasi kuat dari miR-31-5p, | 77 |
| Gambar 36. Analisa <i>in Silico Up-regulated</i> miR-31-5p. | 79 |
| Gambar 37. Interaksi protein-protein dari 60 gen target mRNA-31-5p | 81 |
| Gambar 38. Nilai <i>average reads count</i> has-miR-4286 dari jaringan normal, tumor primer, dan tumor metastasis KSSP. | 82 |
| Gambar 39. Nilai <i>reads count</i> miR-4286 pada tumor primer. Pasien yang masih hidup (warna hijau), pasien yang telah meninggal | 83 |

| | |
|---|----|
| Gambar 40. Ekspresi miR-4286 pada tumor metastasis. Pasien yang masih hidup (warna hijau), pasien yang telah meninggal (warna merah)..... | 83 |
| Gambar 41. Ekspresi miR-4286 menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor primer KSSP dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal. | 84 |
| Gambar 42. <i>Up-regulated</i> miR-4286 pada tumor metastasis KGB KSSP dibandingkan dengan jaringan penis normal ($p<0,05$). | 85 |
| Gambar 43. KEGG <i>pathways</i> dari 100 gen target miR-4286 menampilkan 10 <i>pathways</i> terkuat ($FDR<0,01$). | 86 |
| Gambar 44. A. <i>Functional analysis</i> 60 gen tervalidasi kuat dari miR-4286 menampilkan dalam 10 <i>pathways</i> terkuat..... | 88 |
| Gambar 45. Analisa <i>in Silico</i> overekspresi miR-4286 menekan aktivitas PTEN, TP53, dan FOXO. | 89 |
| Gambar 46. Interaksi protein-protein dari analisis 100 gen target miRNA-4286. (String)..... | 90 |
| Gambar 47. Nilai <i>average reads count</i> dari ekspresi miR-135b-5p,..... | 91 |
| Gambar 48. Nilai <i>reads count</i> miR-135b-5p masing-masing sampel tumor primer | 92 |
| Gambar 49. Nilai <i>reads count</i> miR-135b-5p masing-masing sampel tumor metastasis. <i>Reads count</i> | 92 |
| Gambar 50. Ekspresi miR-135b-5p menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor primer KSSP dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 93 |
| Gambar 51. Ekspresi miR-135b-5p menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor metastasis KSSP dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal (non-tumor)..... | 94 |
| Gambar 52. KEGG <i>pathways</i> dari 18 gen target miR-135b-5p, yang tervalidasi kuat (ShinyGo 0.77)..... | 95 |
| Gambar 53. GO <i>Biological Process</i> dari 18 gen target miR-135b-5p (ShinyGo 0.77). | 96 |
| Gambar 54. GO <i>Cellular component</i> dari 18 gen target dari miR-135b-5p | 97 |
| Gambar 55. GO <i>Mollecular function</i> dari 18 gen target dari miR-135b-5p..... | 97 |

| | |
|---|-----|
| Gambar 56. Analisis <i>signaling pathway</i> dari overekspresi miR-135b-5p yang menekan ekspresi gen SMAD, APC, TGFβR, dan FOXO1..... | 98 |
| Gambar 57. <i>Network</i> interaksi protein-protein dari 18 gen target miR-135b-5p... | 99 |
| Gambar 58. Nilai <i>average reads count</i> dari ekspresi miR-155-5p. Ekspresi miR-155-5p menunjukkan peningkatan dari jaringan penis normal, tumor primer | 100 |
| Gambar 59. Nilai <i>reads count</i> miR-155-5p. Nilai <i>reads count</i> miR-155-5p masing-masing sampel tumor primer | 100 |
| Gambar 60. Nilai <i>reads count</i> miR-155-5p pada tumor metastasis KGB. | 101 |
| Gambar 61. Ekspresi miR-155-5p menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor primer KSSP dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 102 |
| Gambar 62. Ekspresi miR-155-5p menunjukkan <i>up-regulated</i> pada tumor metastasis KSSP dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal (<i>non tumor</i>) ($p<0,01$). | 102 |
| Gambar 63. KEGG <i>pathways</i> dari 98 gen target miR-155-5p yang tervalidasi kuat | 104 |
| Gambar 64. GO <i>Biological Process</i> dari 98 gen target miR-155-5p..... | 105 |
| Gambar 65. GO <i>Cellular component</i> dari 98 gen target miR-155-5p | 105 |
| Gambar 66. <i>Molecular function</i> dari 98 gen target miR-155-5p..... | 106 |
| Gambar 67. Analisis <i>signaling pathway</i> dari overekspresi miR-155-5p yang menekan ekspresi gen SMAD2, PTEN, VHL. | 107 |
| Gambar 68. Network analisis interaksi protein-protein yang merupakan target dari miR-155-5p..... | 108 |
| Gambar 69. Nilai <i>average reads count</i> dari ekspresi miR-1-3p dari jaringan penis normal, | 109 |
| Gambar 70. Nilai <i>reads count</i> miR-1-3p, | 109 |
| Gambar 71. Nilai <i>reads count</i> miR-1-3p | 110 |
| Gambar 72. Ekspresi miR-1-3p menunjukkan <i>down-regulated</i> pada tumor primer KSS penis dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 111 |
| Gambar 73. Ekspresi miR-1-3p menunjukkan <i>down-regulated</i> pada tumor metastasis KSS penis dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 111 |

| | |
|--|-----|
| Gambar 74. KEGG <i>pathways</i> dari 75 gen target miR-1-3p yang tervalidasi kuat | 113 |
| Gambar 75. GO <i>Biological Process</i> dari 75 gen target miR-1-3p yang tervalidasi kuat | 114 |
| Gambar 76. GO <i>Cellular component</i> dari 75 gen target miR-1-3p yang tervalidasi kuat | 114 |
| Gambar 77. GO <i>Mollecular fungsi</i> dari 75 gen target miR-1-3p yang tervalidasi kuat | 115 |
| Gambar 78. Analisis <i>signaling pathway</i> dari <i>down regulated</i> miR-1-3p diprediksi meningkatkan ekspresi gen VEGFA, RAB β , dan CCND1. | 115 |
| Gambar 79. <i>Network</i> analisis interaksi protein-protein yang merupakan target dari miR-1-3p..... | 116 |
| Gambar 80. Nilai <i>average reads count</i> dari ekspresi miR-145-5p pada jaringan penis normal, tumor primer, dan tumor metastasis..... | 117 |
| Gambar 81. Nilai <i>reads count</i> miR-145-5p masing-masing sampel tumor primer dari pasien yang <i>survive</i> dan 3 pasien yang telah meninggal. | 118 |
| Gambar 82. Nilai <i>reads count</i> miR-145-5p masing-masing sampel tumor metastasis dari pasien yang <i>survive</i> dan 3 pasien yang telah meninggal..... | 118 |
| Gambar 83. Ekspresi miR-145-5p menunjukkan <i>down-regulated</i> pada tumor primer KSS penis dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 119 |
| Gambar 84. Ekspresi miR-145-5p menunjukkan <i>down-regulated</i> pada tumor metastasis KSS penis dibandingkan dengan pembandingnya jaringan penis normal | 120 |
| Gambar 85. KEGG <i>pathways</i> dari 63 gen target miR-145-5p yang tervalidasi kuat | 121 |
| Gambar 86. <i>Biological Process</i> dari 63 gen target miR-145-5p yang tervalidasi kuat | 122 |
| Gambar 87. GO <i>Cellular component</i> dari 63 gen target miR-145-5p. | 123 |
| Gambar 88. <i>Mollecular fungsi</i> dari 63 gen target miR-145-5p (ShinyGo 0.77). | 123 |

| | |
|---|-----|
| Gambar 89. Analisa <i>in silico down-regulated</i> miR-145-5p diprediksi meningkatkan aktivitas | 124 |
| Gambar 90. Network Interaksi protein-protein dari 63 gen target miR-145-5p (String)..... | 126 |
| Gambar 91. <i>Epigenetic heterogeneity Dysregulated</i> miRNAs pada tumor primer dan tumor metastasis ke KGB bening, tervalidasi berperan dalam 14 <i>hallmarks of cancer</i> | 128 |
| Gambar 92. Karsinogenesis <i>up-regulated</i> miR-31-5p, miR-155-5p, miR-135-5p, dan miR4286 dengan gen targetnya pada <i>hallmarks of cancer</i> | 159 |
| Gambar 93. Karsinogenesis <i>down-regulated</i> miR-1-3p, dan miR-145-5p dengan gen targetnya pada <i>hallmarks of cancer</i> | 160 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|-----|
| Tabel 1. Kebaruan Penelitian/ <i>Novelty</i> | 6 |
| Tabel 2. Klasifikasi Patologi Karsinoma Sel Skuamosa Penis | 11 |
| Tabel 3. Rancangan data sampel penelitian | 37 |
| Tabel 4. Perhitungan rasio linier | 38 |
| Tabel 5. Perhitungan rasio log2 | 39 |
| Tabel 6. Ekspresi miRNA dengan ekspresi 25 <i>up-regulated</i> tertinggi | 43 |
| Tabel 7. Ekspresi miRNA dengan ekspresi 25 <i>down-regulated</i> terendah | 43 |
| Tabel 8. Rencana Kerja | 48 |
| Tabel 9. Sumber Daya | 49 |
| Tabel 10. Publikasi | 49 |
| Tabel 11. Konsentrasi gen sampel penelitian | 51 |
| Tabel 12. Karakteristik pasien KSSP | 54 |
| Tabel 13. Signifikan <i>up-regulated</i> dan <i>down regulated</i> miRNA dari tumor primer dibandingkan dengan jaringan penis normal | 56 |
| Tabel 14. <i>Up-regulated</i> dan <i>down regulated</i> miRNA dari tumor metastasis dibandingkan dengan kontrol | 60 |
| Tabel 15. Top <i>up-regulated</i> miRNA dan <i>down regulated</i> miRNA dari tumor primer dan metastasis KGB KSSP | 64 |
| Tabel 16. 25 <i>top validated targeted genes</i> pada tumor primer KSSP dan metastasis KGB | 67 |
| Tabel 17. Gen target miR-31-5p | 75 |
| Tabel 18. Gen target miR-4286 | 85 |
| Tabel 19. Gen target miR-135b-5p | 94 |
| Tabel 20. Gen target hsa-miR-155-5p | 103 |
| Tabel 21. Gen target miR-1-3p | 112 |
| Tabel 22. Target Gen miR-145-5p | 120 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|-----|
| Lampiran 1. Prosedur Ekstraksi miRNA | 182 |
| Lampiran 2. Preparasi NanoString Protokol..... | 186 |
| Lampiran 3. Protokol miRNA CodeSet Hybridization Set Up..... | 187 |
| Lampiran 3. Daftar Link Analisis Bioinformatika..... | 188 |
| Lampiran 4. <i>Ethical Clearance</i> | 189 |
| Lampiran 5. 107 miRNA yang signifikan berbeda ekspresinya pada tumor primer dibandingkan dengan jaringan penis normal | 190 |
| Lampiran 6. 81 miRNA yang signifikan berbeda ekspresinya pada tumor metastasis dibandingkan dengan jaringan penis normal..... | 193 |
| Lampiran 7. 100 Gen target tervalidasi yang paling banyak ditarget oleh DEM pada tumor primer..... | 196 |
| Lampiran 8. 100 Gen target tervalidasi yang paling banyak ditarget oleh DEM pada tumor metastasis | 199 |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|---------------|---|
| AGO | : Argonoute |
| ASRI | : <i>Age standardized rate incident</i> |
| AVR | : <i>Average Reads Count</i> |
| CRI | : <i>Crude rate Incident</i> |
| COX-2 | : <i>Cyclooxygenase-2</i> |
| DEM | : <i>Different Expressed miRNA</i> |
| DGCR8 | : <i>DiGeorge syndrom critical region 8</i> |
| DNA | : <i>Dioksi-Ribo-Nucleic Acid</i> |
| ESCRT | : <i>Endosomal Sorting Complex for Transport</i> |
| EMT | : <i>Epithelial Mesenchymal Trantition</i> |
| FC | : <i>Fold Chance</i> |
| FDR | : <i>False Discovery Rate</i> |
| FFPE | : <i>Formalin Fixation and Parafin Embedded</i> |
| GM-CSF | : <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> |
| RO | : <i>Gene Ontology</i> |
| HIF1 α | : <i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i> |
| HPV | : <i>Human Papilloma Virus</i> |
| IL-1 β | : <i>Interleukin-1β</i> |
| IL-2 | : <i>Interleukin-2</i> |
| IL-6 | : <i>Interleukin-6</i> |
| iNOS | : <i>Inducible Nitric Oxcide Synthase</i> |
| JAK-2 | : <i>Janus Kinas-2</i> |
| KEGG | : <i>Kyoto Encyclopedi Genes and Genomes</i> |
| MVB | : <i>Multi Vesicular Body</i> |
| PIN | : <i>Penile Intraepithelial Lesion</i> |
| PGE-2 | : <i>Prostaglandin E-2</i> |
| PG | : <i>Prostaglandin</i> |
| RISC | : <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| Rb | : <i>Retinoblastoma</i> |
| ROS | : <i>Reactive Oxigen Species</i> |
| RNS | : <i>Reactive Nitrogen Species</i> |
| STAT3 | : <i>Signal Transducer and Activator of Transcription-3</i> |
| TNF- α | : <i>Transforming Growth Factor -α</i> |
| TGF- β | : <i>Transforming Growth Factor-β</i> |
| TP | : <i>Tumor Primer</i> |
| TM | : <i>Tumor Metastasis</i> |
| TRBP | : <i>TAR RNA binding protein</i> |
| KEGG | : <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome</i> |

| | |
|----------------|---|
| KGB | : Kelenjar Getah Bening |
| KSS | : Karsinoma Sel Skuamosa |
| KSSP | : Karsinoma Sel Skuamosa Penis |
| LZTFL1 | : <i>Leucine Zipper Transcription Factor L1</i> |
| miRNA | : <i>Micro Ribo-Nucleic Acid</i> |
| NF- κ B | : <i>Nuclear Factor-κB</i> |
| MCP | : Monosit Chemoattractant Protein |
| TLR7/8 | : <i>Toll-like receptor 7/8</i> |
| UVA | : Ultra Violet A |