



**PENGARUH GENISTEIN TOPIKAL TERHADAP SINDROMA *DRY EYE* PADA  
TIKUS OVARIKTOMI MELALUI PERAN SEL EPITEL DAN GOBLET  
KONJUNGTIVA SERTA SEL PUNCA EPITEL LIMBAL**

**DISERTASI**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Doktor**



Oleh :

**ROSY ALDINA**

**NIM. 137070100111015**

**PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN  
KEKHUSUSAN BIOMEDIK**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG  
2018**





**PENGARUH GENISTEIN TOPIKAL TERHADAP SINDROMA DRY EYE PADA  
TIKUS OVARIKTOMI MELALUI PERAN SEL EPITEL DAN GOBLET  
KONJUNGTIVA SERTA SEL PUNCA EPITEL LIMBAL**

**DISERTASI**



Nama Mahasiswa : Rosy Aldina

NIM : 137070100111015

Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Minat : Biomedik

Menyetujui  
**KOMISI PEMBIMBING**

Ketua,

(Prof.dr.M. Aris Widodo, MS., SpFK., Ph.D.)

Anggota 1

Anggota 2

(dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM.)

(Dr.drg. Nur Permatasari, M.Si.)

Mengetahui,

Ketua Program Doktor Ilmu Kedokteran

(Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK)

NIP. 195603311988022001





## IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI

## JUDUL DISERTASI:

PENGARUH GENISTEIN TOPIKAL TERHADAP SINDROMA DRY EYE PADA  
TIKUS OVARIIEKTOMI MELALUI PERAN SEL EPITEL DAN GOBLET  
KONJUNGTIVA SERTA SEL PUNCA EPITEL LIMBAL

NAMA : Rosy Aldina  
NIM : 137070100111015  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Minat : Biomedik

## KOMISI PEMBIMBING

Promotor : Prof.dr. M. Aris Widodo, MS.,SpFK.,Ph.D.  
Ko-Promotor 1 : dr. Hidayat Sujuti, M.Sc.,Ph.D.,SpM.  
Ko-Promotor 2 : Dr.drg. Nur Permatasari, M.Si.

## TIM PENGUJI

Penguji 1 : Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.  
Penguji 2 : Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp.OG (K)  
Penguji Luar : Prof.Dr. Soehardjo, SU.,SpM.(K).

Ujian Proposal : 24 Juni 2015

Seminar Hasil : 16 November 2017

Ujian Tertutup : 24 Januari 2018

Ujian Terbuka : 01 Februari 2018









## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan nikmat, rahmad, taufik dan hidayah-NYA sehingga penelitian dan penulisan disertasi pada Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya ini dapat terselesaikan. Sholawat dan salam senantiasa kita sampaikan kehadiran Rasulullah Muhammad SAW serta para keluarga dan sahabatnya. Teriring doa, Semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi kemajuan Ilmu Pengetahuan dan Masyarakat.

Pengaruh Genistein Topikal terhadap Sindroma *Dry Eye* masih belum jelas, sehingga kami melakukan penelitian *in vivo* tentang patobiomolekular genistein terhadap Sindroma *Dry Eye*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh genistein topikal terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi melalui peran RE  $\beta$ ; NF-KB; IL1  $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal sehingga menambah pengetahuan terhadap etio-patomekanisme SDE. Hasil penelitian ini harapannya dapat digunakan sebagai dasar pendekatan terapi anti inflamasi baik melalui peran, dosis, dan lamanya pemberian genistein topikal pada SDE. Pemeriksaan *marker* molekuler sel punca limbal dimasa mendatang nantinya dapat digunakan sebagai kit diagnostik dan pendekatan terapi SDE dengan keterlibatan limbal.

Dengan selesainya penulisan disertasi ini, perkenankan penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Pemerintah Republik Indonesia melalui Kementerian pendidikan dan kebudayaan yang telah memberikan bantuan dana BPPS pada Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.





2. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas dana hibah kompetitif DPP/SPP tahun 2015 yang turut membantu dalam pendanaan disertasi pada pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
3. Rektor Universitas Brawijaya Malang Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS serta mantan Rektor Prof. Dr. Ir. Yogi Sugito atas ijin dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr. dr. Sri Andarini, mantan Dekan FKUB Dr.dr. Karyono Mintaroem MS, SpPA, alm Dr.dr. Samsul Islam, SpMK. MKes atas kesempatan, dukungan dan fasilitas yang diberikan dalam penyelesaian pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
5. Ketua Program Pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, mantan Ketua Program Pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran FKUB Prof.dr.M.Aris Widodo,MS.,SpFK.,Ph.D yang juga sekaligus sebagai promotor dan pengajar mata kuliah penunjang disertasi, yang dengan sabar meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan arahan dan dorongan semangat dalam pelaksanaan penelitian hingga penulisan disertasi.
6. Dr. Hidayat Suyuti SpM Ph.D, selaku kopromotor 1, Pembimbing akademik dan pengajar mata kuliah penunjang disertasi, yang telah banyak memberikan dukungan yang luar biasa, wawasan, motivasi, saran, waktu dan segala keikhlasan membimbing penulis





7. Dr.dr.g. Nur Permatasari, M.Si, selaku kopromotor 2, atas ilmu pengetahuan, saran dan masukan yang sangat kritis terutama dalam hal penulisan, juga kesabaran, pengertian dan kerelaan membagi ilmu kepada penulis
8. Prof. Dr. Soehardjo SU, SpM (K), selaku penguji tamu, atas kesediaannya meluangkan waktu untuk menguji ke Malang, perhatian, pengertian, saran, dan motivasi untuk terus mengembangkan diri yang diberikan kepada penulis, bahkan sejak penulis menempuh Pendidikan dokter spesialis mata di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjahmada.
9. Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES., selaku penguji disertasi, atas koreksi yang sangat teliti, atas inspirasi, saran dan masukan yang sangat berharga kepada penulis.
10. Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp.OG, selaku penguji disertasi, atas koreksi yang sangat teliti, atas inspirasi, saran dan masukan yang sangat berharga kepada penulis.
11. Seluruh evaluator Dra. Sri Widiarti, M.Sc., Dr.dr Nurdiana, M.Kes serta seluruh pengajar di program pasca sarjana Fakultas Kedokteran Univesitas Brawijaya
12. Kepala Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata, dr. Hariwati M SpM (K), dan mantan Kepala Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata, dr. Elfina G. Sadono SpM (K) atas perhatian dan motivasi yang luar biasa diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan disertasi. Seluruh teman sejawat di Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata yang selalu memberikan dorongan semangat, pengertian serta doa yang tiada hentinya selama menjalani proses pendidikan pasca sarjana ini, serta seluruh staf administrasi yang telah banyak membantu dan mendukung penulis.





13. Dr. Safarudin Refa SpM (KVR) dan dr.M. Maksun Effendi SpM (K) beserta seluruh sejawat di *Malang Eye Center* atas doa, semangat, perhatian yang selalu menemani langkah penulis.

14. Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr.dr. Umi Kalsum., M.Kes yang telah memberikan ijin dan fasilitas serta kemudahan dalam pelaksanaan penelitian. Khusus kepada Dr. Husnul Khotimah yang telaten berdiskusi dan memberi masukan, serta Ibu Ferida, SP (analisis Farmakologi), Mas Memet (Laboran Farmakologi), serta seluruh staf administrasi.

15. Kepala dan staf Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, khususnya bapak Mijan dengan keahliannya dalam pembuatan preparat

16. Kepala Laboratorium dan seluruh staf Laboratorium Sentral dan Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, khususnya Saudara Choirunil Chotimah, M.Si. yang telah meluangkan waktu dan kemampuannya dalam pengecatan Imunofluoresensi dan pengamatan mikroskop konfokal.

17. Bapak Satuman, SSi. M.Kes atas bantuan pengadaan antibodi dan pengamatan mikroskop konfokal, Ibu Mardiana Sri Sutanti, SSi., MSi atas bantuan analisis statistiknya, dan Saudara dr. Bambang.

18. Semua guru-guru saya mulai dari TK, SD, SMP, SMA hingga perguruan tinggi yang telah memberikan pengajaran dan pendidikan. Seluruh sejawat FKUB angkatan 1980 atas dorongan semangat dan doanya.

19. Rekan-rekan Program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas motivasi, dukungan dan doa yang sangat berarti bagi penulis.





20. dr. Ovi, dr. Efrizal, dr. Teddy yang tergabung dalam penelitian kami atas kerjasamanya dan semangatnya dalam melakukan penelitian.

21. Seluruh staf administrasi di lingkungan Pasca Sarjana Program Doktor Fakultas Kedokteran di Universitas Brawijaya yang telah membantu melancarkan proses administrasi selama menjalani pendidikan.

22. Keluarga besar H. Asyik Sukisman (Alm) dan Hj. Amsal Cholis, saudara-saudaraku tercinta atas segala jerih payah doa, perhatian, pengorbanan dan kasih sayang yang diberikan.

23. Keluarga besar H. Munawar (Alm) dan Hj. Nurjanah, dan saudara-saudara atas segala doa, dukungan, semangat, motivasi dan kasih sayang yang diberikan kepada penulis.

24. Suami tercinta, anak, anak mantu, dan cucu-cucu tersayang, atas curahan cinta dan kasih sayang, kesetiaan, pengertian, pengorbanan, jerih payah, kesabaran dan segala-galanya yang tak terhingga, yang telah, sedang dan Insyaallah akan selalu diberikan kepada penulis.

25. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan, dan masukan dalam penyusunan disertasi.

Jazakallahu khairan katsira, Terimakasih yang sebesar-besarnya penulis ucapkan untuk semua pihak baik yang tersebut diatas. Semoga Allah SWT membalas semuanya dengan yang lebih baik, dengan pahala yang berlipat dan limpahan nikmat dan karuniaNYA.





Sangat disadari dalam proses perjalanan penulis menempuh pendidikan doktor ini banyak kesalahan baik dalam tutur kata, perilaku, sikap dan perbuatan, maka segala kerendahan hati penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya kepada semua pihak.

Malang, Januari 2018

Penulis





## RINGKASAN

**Rosy Aldina**, NIM137070100111015. Program Pasca Sarjana - Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 16-November-2017. Pengaruh genistein topikal terhadap Sindroma *Dry Eye* pada tikus ovariektomi melalui peran sel epitel dan goblet konjungtiva serta sel punca epitel limbal.

Sindroma *Dry Eye* (SDE) merupakan penyakit multifaktorial dengan potensi kerusakan pada permukaan mata dan air mata. Permukaan mata adalah mukosa khusus yang terdapat pada konjungtiva, limbal korneosklera dan kornea. Hiperosmolaritas air mata merupakan mekanisme sentral yang menyebabkan inflamasi, kerusakan, dan simptom pada permukaan mata.

Prevalensi utama SDE pada wanita pasca menopause yang terjadi penurunan sekresi estrogen (terutama  $17\beta$ -estradiol) dan mengakibatkan kompleks Reseptor Estrogen (RE)-ligan dalam nukleus akan menurun. Sedangkan diketahui RE terdapat pada epitel konjungtiva yang bersifat estrogen-sensitiv. Selain itu fungsi RE meregulasi *stemness* atau diferensiasi sel punca. Limbal merupakan sel progenitor yang mempunyai respon terhadap homeostasis, sumber utama regenerasi serta barrier sel epitel kornea dan sel epitel konjungtiva.

Genistein dapat menggantikan  $17\beta$ -estradiol sebagai ligand yang berikatan dengan RE meskipun afinitasnya lebih rendah dibanding estrogen. Komplek RE-genistein akan menghambat aktivasi promotor gen sitokin proinflamasi, sehingga ekspresi sitokin proinflamasi akan menurun, proses inflamasi pada kornea dan konjungtiva juga akan menurun. Proses apoptosis sel goblet konjungtiva menurun sehingga produksi musin akan meningkat. Penurunan inflamasi serta peningkatan produksi musin diharapkan dapat memperbaiki permukaan mata. Pada literatur disebutkan bahwa respon anti inflamasi flavonoid tidak ada mekanisme definitif atau *single* sehingga menerangkan bahwa semua efek phenol mempunyai sinyal spesifik dan tergantung dari tipe sel.

Sampai saat ini peran hormon estrogen pada etio-patomekanisme SDE dan inflamasi kelenjar lakrimal masih banyak perdebatan, tidak jelas, dan kontroversial. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh genistein pada SDE, melalui peran RE $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; p63, K12, dan K13 sel punca epitel limbal pada tikus model SDE dengan ovariektomi.

Penelitian ini merupakan eksperimental murni secara *in vivo*. Setelah tikus mengalami ovariektomi 1 bulan, dilakukan tes diagnostik SDE dengan tes Schirmer, FBUT, dan Ferning. Bila SDE, diberi perlakuan genistein topikal 4x sehari setetes selama 1 minggu masing masing per kelompok perlakuan dosis 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M; sedang kelompok kontrol diberi BSS. Penelitian tahap 1 bertujuan untuk mengetahui perbedaan hasil tes diagnostik SDE melalui pemeriksaan tes Schirmer; tes Ferning dan tes FBUT pada tikus OVX dan tikus OVX dengan perlakuan genistein dosis 50  $\mu$ M, dosis 100  $\mu$ M, dosis 200  $\mu$ M.

Pembuatan preparat jaringan dilakukan dengan paraffin blok. Selanjutnya dilakukan pemotongan, yang bagus akan menghasilkan bentuk potongan seperti pita. Setelah pembuatan preparat, diberikan Antibodi primer spesifik yang digunakan adalah anti rat RE $\beta$  *antibody*; anti rat IL-1 $\beta$  *antibody*; anti rat NF-kB *antibody*; anti rat MUC5AC *antibody*; anti rat K12 *antibody*; anti rat K13 *antibody*. Setelah itu





inkubasi dengan antibodi sekunder yang dilabeling dengan FITC adalah untuk IL-1 $\beta$ , MUC-5AC, dan K12 akan memberikan pendaran warna hijau, sedangkan labeling Rhodamin untuk RE $\beta$ , NF-kB, K13 memberikan pendaran warna merah dan p63 dengan antibodi sekunder anti mouse IgG dengan label peroxidase, terlihat sebagai pendaran warna coklat. Pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop konfokal laser LSCM tipe Olympus fluo FV 10-ASW 1.7, dengan perbesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang.

Penelitian tahap 1 didapatkan bahwa perlakuan genistein dosis 50-200  $\mu$ M meningkatkan hasil tes Schirmer. Perlakuan genistein dosis 50-200  $\mu$ M menurunkan hasil tes Ferning. Perlakuan genistein dosis 50-200  $\mu$ M meningkatkan hasil tes FBUT. Hasil analisa data penelitian tahap 2 terdapat peningkatan signifikan RE- $\beta$  pada kelompok perlakuan genistein 100  $\mu$ M, tetapi masih di bawah kelompok kontrol negatif. Perbandingan rata-rata RE- $\beta$  pada genistein 100  $\mu$ M berbeda bermakna dengan RE- $\beta$  genistein 50  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, kontrol positif dan negatif, yang berarti terdapat regulasi RE $\beta$  - ligan pada sel epitel konjungtiva. Terdapat rata-rata rasio ekspresi IL-1 $\beta$  paling rendah pada kelompok perlakuan genistein 100  $\mu$ M dan IL-1 $\beta$  meningkat pada kontrol positif dibanding dengan kontrol negatif. Terdapat perbedaan ekspresi NF-kB pada kelompok perlakuan genistein dengan nilai signifikan. Pada kelompok perlakuan genistein 100  $\mu$ M dapat lebih menurunkan NF-kB daripada 50  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M. Adapun pemberian genistein pada 200  $\mu$ M masih lebih baik dalam menurunkan NF-kB daripada kontrol positif, yang berarti, genistein dapat menghambat faktor transkripsi NF-kB yang berperan penting dalam inflamasi sel epitel konjungtiva pada SDE. Rasio rata-rata ekspresi MUC-5AC paling tinggi pada kelompok perlakuan geistein 100  $\mu$ M. Terdapat perbedaan signifikan ekspresi MUC-5AC pada kelompok perlakuan genistein. Pada kelompok kontrol positif hasil ekspresi MUC-5AC menurun dibanding dengan kelompok kontrol negatif, yang berarti sel goblet konjungtiva pada SDE terdapat penurunan ekspresi MUC5AC. Pada sel epitel punca limbal terdapat perbedaan ekspresi K12 pada kelompok perlakuan genistein. Kelompok perlakuan genistein 200  $\mu$ M dapat lebih menurunkan K12 daripada 100  $\mu$ M. Pada sel epitel punca limbal terdapat perbedaan ekspresi K13 pada kelompok perlakuan genistein. Kelompok perlakuan genistein 200  $\mu$ M dapat lebih menurunkan K13 daripada 100  $\mu$ M dan 50  $\mu$ M. Pada sel epitel punca limbal terdapat perbedaan bermakna ekspresi p63 pada kelompok perlakuan genistein, rata-rata ekspresi p63 pada kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan genistein 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M dan kontrol negatif, p63 pada kelompok kontrol positif tidak berbeda bermakna dengan p63 pada kelompok dosis 50  $\mu$ M.

Hasil uji analisa statistik menggunakan *path analysis* dengan pendekatan Partial Least Square untuk IL-1 $\beta$  terhadap SDE menunjukkan nilai t-statistik 2.128, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara IL-1 $\beta$  terhadap SDE sebesar 0.264. Pengaruh positif antara IL-1 $\beta$  terhadap SDE diartikan bahwa semakin tinggi IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan SDE. Demikian sebaliknya, semakin rendah IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan resiko SDE. IL-1 $\beta$  terhadap K12 menunjukkan nilai t-statistik 3.011, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara IL-1 $\beta$  terhadap K12 sebesar 0.614. Pengaruh positif antara IL-1 $\beta$  terhadap K12 diartikan bahwa semakin tinggi IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan K12. Demikian sebaliknya, semakin rendah IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan K12. IL-1 $\beta$  terhadap K13





menunjukkan nilai t-statistik 6.434, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara IL-1 $\beta$  terhadap K13 sebesar 0.974. Pengaruh positif antara IL-1 $\beta$  terhadap K13 diartikan bahwa semakin tinggi IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan K13. Demikian sebaliknya, semakin rendah IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan K13. IL-1 $\beta$  terhadap MUC-5AC menunjukkan nilai t-statistik 9.655, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara IL-1 $\beta$  terhadap MUC-5AC sebesar -0.732. Pengaruh negatif antara IL-1 $\beta$  terhadap MUC-5AC dapat diartikan bahwa semakin tinggi IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan MUC-5AC. Demikian sebaliknya, semakin rendah IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan MUC-5AC. IL-1 $\beta$  terhadap p63 menunjukkan nilai t-statistik 2.447, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara IL-1 $\beta$  terhadap p63 -0.560. Pengaruh negatif antara IL-1 $\beta$  terhadap p63 dapat diartikan bahwa semakin tinggi IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan p63. Demikian sebaliknya, semakin rendah IL-1 $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan p63. K13 terhadap SDE menunjukkan nilai t-statistik 8.258, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara K13 terhadap SDE sebesar 0.648. Pengaruh positif antara K13 terhadap SDE dapat diartikan bahwa semakin tinggi K13, maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan SDE. Demikian sebaliknya, semakin rendah K13, maka hal itu akan diikuti oleh penurunan SDE. K12 terhadap K13 menunjukkan nilai t-statistik 3.031, dimana nilai tersebut lebih besar dari 1.96 untuk uji dua arah dengan taraf kesalahan  $\alpha=5\%$ , sehingga hipotesis statistik yang menyatakan tidak ada pengaruh langsung antara K12 terhadap K13 ditolak. Dengan kata lain, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung yang signifikan antara K12 terhadap K13 sebesar 0.302. Pengaruh positif antara K12 terhadap K13 dapat diartikan bahwa semakin tinggi K12, maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan K13. Demikian sebaliknya, semakin rendah K12, maka hal itu akan diikuti oleh penurunan K13. MUC-5AC terhadap SDE menunjukkan *loading factor* -0.372 dengan nilai t-statistik 3.515, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara MUC-5AC terhadap SDE sebesar -0.372. Pengaruh negatif antara MUC-5AC terhadap SDE dapat diartikan bahwa semakin tinggi MUC-5AC, maka hal itu akan diikuti oleh penurunan resiko SDE. Demikian sebaliknya, semakin rendah MUC-5AC, maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan SDE. NF-kB terhadap SDE menunjukkan *loading factor* sebesar -0.315 dengan nilai t-statistik 2.344, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara NF-kB terhadap SDE sebesar -0.315. Pengaruh negatif antara NF-kB terhadap SDE dapat diartikan bahwa semakin tinggi NF-kB, maka hal itu akan diikuti oleh penurunan resiko SDE. Demikian sebaliknya, semakin rendah NF-kB, maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan SDE. NF-kB terhadap IL-1 $\beta$  menunjukkan nilai t-statistik 4.935, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara NF-kB terhadap IL-1 $\beta$  sebesar 0.682. Pengaruh positif antara NF-kB terhadap IL-1 $\beta$  dapat diartikan bahwa semakin tinggi NF-kB, maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan IL-1 $\beta$ . Demikian sebaliknya, semakin rendah NF-kB, maka hal itu akan diikuti oleh penurunan IL-1 $\beta$ . RE- $\beta$  terhadap IL-1 $\beta$  menunjukkan *loading factor* -0.260 dengan nilai t-statistik 2.023, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara RE- $\beta$  terhadap IL-1 $\beta$  sebesar -0.260. Pengaruh negatif antara RE- $\beta$  terhadap IL-1 $\beta$  dapat diartikan bahwa semakin tinggi RE- $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan IL-1 $\beta$ . Demikian sebaliknya, semakin rendah RE- $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh





peningkatan IL-1 $\beta$ . RE- $\beta$  terhadap K12 nilai t-statistik 0.190, menunjukkan tidak adanya pengaruh langsung signifikan antara RE- $\beta$  terhadap K12 dengan koefisien path yang tergolong lemah sebesar -0.031. Dengan kata lain, tinggi rendahnya RE- $\beta$  tidak mempengaruhi peningkatan atau penurunan K12. RE- $\beta$  terhadap K13 sebesar 0.596 menunjukkan nilai t-statistik 4.062, menunjukkan adanya pengaruh langsung yang signifikan antara RE- $\beta$  terhadap K13 sebesar 0.596. Pengaruh positif antara RE- $\beta$  terhadap K13 dapat diartikan bahwa semakin tinggi RE- $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan K13. Demikian sebaliknya, semakin rendah RE- $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan K13. RE- $\beta$  terhadap NF-kB nilai t-statistik sebesar 24.466, hal ini menunjukkan adanya pengaruh langsung signifikan antara RE- $\beta$  terhadap NF-kB sebesar -0.836. Pengaruh negatif antara RE- $\beta$  terhadap NF-kB dapat diartikan bahwa semakin tinggi RE- $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh penurunan NF-kB. Demikian sebaliknya, semakin rendah RE- $\beta$ , maka hal itu akan diikuti oleh peningkatan NF-kB. RE- $\beta$  terhadap p63 menunjukkan -0.144 dengan nilai t-statistik sebesar 0.518, hal ini menunjukkan tidak adanya pengaruh langsung signifikan antara RE- $\beta$  terhadap p63, sehingga tinggi rendahnya RE- $\beta$  tidak mempengaruhi tinggi rendahnya p63.

Disimpulkan bahwa genistein dosis 100  $\mu$ M meningkatkan ekspresi RE- $\beta$ , MUC-5AC dengan rata-rata paling tinggi; dan rata-rata ekspresi NF-kB, IL-1 $\beta$  paling rendah. Genistein dosis 200  $\mu$ M dapat lebih menurunkan K12, K13 daripada dosis 100  $\mu$ M dan dosis 50  $\mu$ M. Genistein 200  $\mu$ M dapat meningkatkan ekspresi p63 dengan rata-rata paling tinggi. Adanya pengaruh langsung signifikan antara dosis genistein terhadap RE- $\beta$ ; IL-1 $\beta$  terhadap SDE; IL-1 $\beta$  terhadap K12; IL-1 $\beta$  terhadap K13; IL-1 $\beta$  terhadap MUC-5AC; IL-1 $\beta$  terhadap p63; K13 terhadap SDE; K12 terhadap K13; MUC-5AC terhadap SDE; NF-kB terhadap SDE; NF-kB terhadap IL-1 $\beta$ ; RE- $\beta$  terhadap IL-1 $\beta$ ; RE- $\beta$  terhadap K13; RE- $\beta$  terhadap NF-kB. Tidak ada pengaruh langsung yang signifikan antara RE- $\beta$  terhadap K12; RE- $\beta$  terhadap p63.





## SUMMARY

**Rosy Aldina**, NIM137070100111015. POST GRADUATE Program – Faculty of Medicine, Brawijaya University Malang, 16 November 2017. Effect of topical genistein on *Dry Eye Syndrome* in ovariectomy mouse through the role of epithelial and goblet conjunctival cells and limbal epithelial stem cell.

*Dry Eye Syndrome* (DES) is a multifactorial disease with a damaging potential to the ocular surface and tear film. The ocular surface is a specific mucous that is located in the conjunctiva, corneoscleral limbus, and cornea. Hiperosmolarity is a central mechanism, resulting in inflammation, damage and symptom on ocular surface.

The main prevalence of DES is in post menstrual woman, resulting in the decreased estrogen excretion (particularly  $17\beta$ -estradiol) and causes complex Receptor Estrogen (RE)-ligand in nucleus to decrease. It is known that RE is in conjunctival epithel which is estrogen-sensitive. Also, RE function is to regulate stemness or stem cell differentiation. Limbal is progenitor cell having responses to homeostasis, a main source of regeneration as well as barriers of epithelial cell of cornea and conjunctival epithelial cells.

Genistein can substitute  $17\beta$ -estradiol as ligand bound with RE, despite its lower affinity compared to estrogen. Complex RE-genistein will inhibit promoter activation of proinflammatory cytokine gene, so that expression of proinflammatory cytokine will decline and inflammatory process on cornea will also be declined. Goblet cell apoptosis process declines, resulting in the increased mucin production. The decreased inflammation and the increased mucin production are expected to improve ocular surface. Some literatures stated that flavonoid as inflammatory agent does not have definitive mechanism or single so that it all explains that all effects of phenol have specific signals, depending on cell type.

Up to now, the role of estrogen hormone on etio-pathomechanism of DES and inflammation of lacrimal gland has still been subject of debates, inconclusive and controversial. Thus, this research aims to find out the impact of genistein on SDE, through the role of RE $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  conjunctiva epithelial cell; MUC5AC of conjunctival goblet cell; p63, K12, and K13 limbal epithelial stem cell on SDE mouse cell with ovariectomy.

This is pure experimental research in vivo. After the mouse experiences 1 month of ovariectomy, DES diagnostic test is performed, consisting of Schirmer test, FBUT, and Ferning. DES is given topical genistein 4 times a day over a week. Each group is given dosages of 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M; while the control group is given BSS. The preparation of tissue sample is done through paraffin block. Next, is the excision phase. The proper excision will result a ribbon-shaped section. After preparation, the specific primary antibody given is anti rat RE $\beta$  *antibody*, anti rat IL-1 $\beta$  *antibody*, anti rat NF-kB *antibody*, anti rat MUC5AC *antibody*, anti rat K12 *antibody*, anti rat K13 *antibody*. Having done that, the secondary antibody incubation that is given the FITC label for IL-1 $\beta$ , MUC-5AC, and K12 will give off a green luminescence. Rhodamin label for RE $\beta$ , NF-kB, K13 will give off reddish luminescence. Meanwhile, p63 with the secondary anti mouse IgG antibody that is labeled with peroxidase will give off brownish luminescence. Examination is done





through Olympus fluo FV 10-ASW 1.7type, LSCM confocal laser microscope with 400 times magnification with 5 fields of view.

According to the data analysis, there has been a significant increase of RE- $\beta$  on the 100  $\mu$ M, but still below the negative control group. Average comparison of 100  $\mu$ M genistein RE- $\beta$  differs from 50  $\mu$ M and 200  $\mu$ M genistein RE- $\beta$ , positive and negative control, indicating the presence of RE- $\beta$  regulation – ligan on the conjunctival epithelial cell. It is shown that the average expression ratio of IL-1 $\beta$  is the lowest in the 100  $\mu$ M treatment group and IL-1 $\beta$  increases in the positive control instead of the negative control. There is a different NF- $\kappa$ B expression on the genistein group with a significant value. The 100  $\mu$ M treatment group can more easily decrease NF- $\kappa$ B than the 50  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M treatment. 50  $\mu$ M genistein treatment decrease NF- $\kappa$ B much more easily than the 200  $\mu$ M. The 200  $\mu$ M genistein treatment is still better at decreasing NF- $\kappa$ B than the positive control, which means that genistein inhibits the transcription factor of NF- $\kappa$ B that plays an important role in conjunctival epithelial cell inflammation on DES. The highest average expression ratio of MUC-5AC belongs to the 100  $\mu$ M genistein treatment. There seems to be a significant expression difference of MUC-5AC on the genistein treatment groups. On the positive control group, the MUC-5AC expression result decreases in comparison to the negative control group, which can only means that the conjunctival goblet cells on the SDE experience a decrease of expression in MUC-5AC. Meanwhile, on the limbal epithelial stem cell, there has been a difference in the K12 expression on the genistein treatment groups. 200  $\mu$ M genistein treatment group can decrease K12 more, than the 100  $\mu$ M treatment. On the limbal epithelial stem cell, there have been some K13 expression differences on the genistein treatment group. 200  $\mu$ M genistein treatment group can decrease K13 more easily than 100  $\mu$ M dan 50  $\mu$ M treatment. On the limbal epithelial stem cell, there have been some distinct differences in the p63 expression on the genistein treatment groups. The average p63 expression on the positive control group differs from the 100  $\mu$ M and 200  $\mu$ M treatment, and the negative control. P63 on the positive control group has no significant difference in comparison with the 50  $\mu$ M dosage.

The result of statistical analysis using *path analysis* with Partial Least Square approach for IL-1 $\beta$  toward DES, t-statistics 2.128, this indicates that there is a significant, direct effect between IL-1 $\beta$  and DES making up 0.264. The positive effect between IL-1 $\beta$  on DES It means that the increase of IL-1 $\beta$  causes the increase of DES. It also goes both ways, the decrease of IL-1 $\beta$  causes the decrease of DES. IL-1 $\beta$  towards K12 shows a t-statistics of 3.011, indicating that there is a significant, direct impact of IL-1 $\beta$  towards K12 equal to 0,614. The positive effect between IL-1 $\beta$  on K12 it means that it can be concluded that the increase of IL-1 $\beta$  causes the increase of K12. It also goes both ways, the decrease of IL-1 $\beta$  causes the decrease of K12. The direct impact of IL-1 $\beta$  towards K13 is equal to 0.974 with a t-statistics of 6,434, indicating that there is a significant. The positive effect between IL-1 $\beta$  on K13 it means that it can be concluded that the increase of IL-1 $\beta$  causes the increase of K13. It also goes both ways, the decrease of IL-1 $\beta$  causes the decrease of K13. The direct impact of IL-1 $\beta$  towards MUC5AC is equal to -0.732 with t-statistics of 9.655, indicating that there is a significant. The negative effect between IL-1 $\beta$  on MUC5AC it means that it can be concluded that the increase of IL-1 $\beta$  causes the decrease of MUC5AC. It also goes both ways, the decrease of IL-1 $\beta$  causes the increase of





MUC5AC. The direct impact of IL-1 $\beta$  towards p63 results in the t-statistics of 2.447, indicating that there is a significant, direct impact that amounts to -0.560. The negative effect between IL-1 $\beta$  on p63 it means that it can be concluded that the increase of IL-1 $\beta$  causes the decrease of p63. It also goes both way, the decrease of IL-1 $\beta$  causes the increase of p63. K13 towards DES shows a t-statistics of 8.258, indicating that there is a significant, direct impact of K13 towards DES equal to 0.648. The positive effect between K13 on DES it means that it can be concluded that the increase of K13 causes the increase of DES. It also goes both ways, the decrease of K13 causes the decrease of DES. K12 towards K13 shows a t-statistics of 3.031, indicating that there is a significant, direct impact of K12 towards K13 equal to 0.302. The positive effect between K12 on K13 it means that it can be concluded that the increase of K12 causes the increase of K13. It also goes both ways, the decrease of K12 causes the decrease of K13. MUC5AC towards DES shows a t-statistics of 3.515, indicating that there is a significant, direct impact of MUC5AC towards DES equal to -0.372. The negative effect between MUC5AC on DES it means that it can be concluded that the increase of MUC5AC causes the decrease of DES. It also goes both ways, the decrease of MUC5AC causes the increase of DES. NF-kB towards DES shows a t-statistics of 2.344, indicating that there is a significant, direct impact of NF-kB towards DES equal to -0.315. The negative effect between NF-kB on DES it means that it can be concluded that the increase of NF-kB causes the decrease of DES. It also goes both ways, the decrease of NF-kB causes the increase of DES. NF-kB towards IL-1 $\beta$  shows a t-statistics of 4.935, indicating that there is a significant, direct impact of NF-kB towards IL-1 $\beta$  equal to 0.682. The positive effect between NF-kB on IL-1 $\beta$  it means that it can be concluded that the increase of NF-kB causes the increase of IL-1 $\beta$ . It also goes both ways, the decrease of NF-kB causes the decrease of IL-1 $\beta$ . RE- $\beta$  towards IL-1 $\beta$  shows a t-statistics of 2.023, indicating that there is a significant, direct impact of RE- $\beta$  towards IL-1 $\beta$  equal to -0.260. The negative effect between RE- $\beta$  on IL-1 $\beta$  it means that it can be concluded that the increase of RE- $\beta$  causes the decrease of IL-1 $\beta$ . It also goes both ways, the decrease of RE- $\beta$  causes the increase of IL-1 $\beta$ . RE- $\beta$  towards K12 shows a t-statistics of 0.190. It is no direct effect significant between RE- $\beta$  towards K12 with a weak coefficient path of 0, 031. In other words, high low RE- $\beta$  does not effect to increase or decrease of K12. RE- $\beta$  towards K13 shows a t-statistics of 4.062, indicating that there is a significant, direct impact of RE- $\beta$  towards K13 equal to 0.596. The positive effect between RE- $\beta$  on K13 it means that it can be concluded that the increase of RE- $\beta$  causes the increase of K13. It also goes both ways, the decrease of RE- $\beta$  causes the decrease of K13. RE- $\beta$  towards NF-kB shows a t-statistics of 24.466, indicating that there is a significant, direct impact of RE- $\beta$  towards NF-kB equal to -0.836. The negative effect between RE- $\beta$  on NF-kB it means that it can be concluded that the increase of RE- $\beta$  causes the decrease of NF-kB. It also goes both ways, the decrease of RE- $\beta$  causes the increase of NF-kB. RE- $\beta$  towards p63 shows -0.144 with a t-statistics of 0.518, It is no direct effect significant between RE- $\beta$  towards p63. In other words, high low RE- $\beta$  does not effect to increase or decrease of p63.

It is concluded that dosage of 100  $\mu$ M of genistein increases expression of RE- $\beta$ , MUC-5AC with the highest mean; and expression average of NF-kB, IL-1 $\beta$  the lowest. Genistein of 200  $\mu$ M dose can decrease K12, K13 more than 100  $\mu$ M and 50





$\mu\text{M}$  doses. Genistein of 200  $\mu\text{M}$  can increase expression of p63 having the highest average. There is significance direct effect between genistein dose towards RE- $\beta$ ; IL-1 $\beta$  towards DES; between IL-1 $\beta$  and K12; between IL-1 $\beta$  and K13; between IL-1 $\beta$  and MUC5AC; between IL-1 $\beta$  and p63; between K13 and DES; between K12 and K13; between MUC5AC and DES; NF-kB and DES; NF-kB and IL-1 $\beta$ ; between RE- $\beta$  and IL-1 $\beta$ ; RE- $\beta$  and K13; RE- $\beta$  and NF-kB. There is no significant direct effect between RE- $\beta$  and K12; between RE- $\beta$  and p63.





**DAFTAR ISI**

Halaman

Judul.....	i
Identitas Tim Penguji Disertasi.....	iii
Kata Pengantar .....	v
Ringkasan.....	xi
Summary.....	xv
Daftar Isi.....	xix
Daftar Tabel.....	xxvi
Daftar Gambar.....	xxviii
Daftar Singkatan.....	xxxii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	7
1.2.1 Sub masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.3.1 Tujuan umum.....	8
1.3.2 Tujuan khusus.....	8
1.4 Manfaat penelitian.....	9
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	9
1.4.2 Manfaat Klinis.....	9
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>10</b>
2.1 Sindroma Dry Eye (SDE).....	10
2.1.1 Dry Eye: Sindroma inflamasi pada permukaan mata atau Ocular Surface (OS).....	11





2.1.2 Epidemiologi SDE.....	12
2.1.3 Klasifikasi: Etiologi mayor SDE.....	13
2.1.4 Mekanisme SDE.....	14
2.1.4.1 Perbedaan Gender pada Kelenjar Lakrimal.....	16
2.1.4.2 Unit Fungsional Lakrimal: Suatu Mekanisme Homeostatis.....	18
2.1.4.3 Hiperosmolaritas Air Mata.....	19
2.1.4.4 Ketidakstabilan Tear Film (TF).....	19
2.1.4.5 Struktur dan stabilitas Tear Film (TF).....	20
2.1.4.5.1 Lapisan Musin.....	21
2.1.4.5.1.1 Struktur dan fungsi sel goblet konjungtiva.....	21
2.1.4.5.2 Lapisan Akuos.....	22
2.1.4.5.3 Lapisan lipid.....	23
2.1.4.6 Efek Aging.....	23
2.1.4.7 Symptomatic Ocular Surface Disease (SOSD).....	24
2.1.4.8 Konjungtiva dan Tear Film (TF).....	25
2.1.5 Efek Patologi Syndrome Dry Eye (SDE) pada permukaan mata/ Ocular Surface.....	27
2.1.6 Pengaruh Seks dan Hormon Seks Steroid (HSS) pada Syndrome Dry Eye (SDE).....	29
2.1.6.1 Struktur dan Fungsi Reseptor Estrogen (RE).....	33
2.1.6.2 Mekanisme kerja Hormon Seks Steroid (HSS).....	35
2.1.7 Genistein.....	38
2.1.7.1 Struktur dan Morfologi Genistein.....	38
2.1.7.2 Mekanisme kerja fitoestrogen.....	39
2.1.7.3 Sifat Fisika dan Kimia Isoflavon.....	42





2.1.7.4 Bioavailabilitas topikal Flavonoid pada mata .....	42
2.1.7.5 Mekanisme farmakologi anti-inflamasi flavonoid .....	43
2.1.8 Delivery obat pada okuler .....	44
2.1.9 NF- $\kappa$ B pathway pada permukaan mata .....	46
2.1.9.1 NF- $\kappa$ B pathway melalui regulasi respon inflamasi karena stress ....	47
2.1.9.1.1 Tipe stress dengan sinyal trigger NF- $\kappa$ B .....	48
2.1.9.1.2 Tipe stress dengan Stimulasi oleh sitokin spesifik .....	48
2.1.10 Interleukin-1 (IL-1) $\beta$ .....	49
2.1.11 Sel Punca Limbal (LSC) .....	50
2.1.11.1 Karakteristik Sel Punca Limbal .....	52
2.1.11.1.1 Ukuran Sel Dan Morfologi .....	52
2.1.11.1.2 Slow cycling dan Self-renewal .....	53
2.1.11.2 Sel punca epitel konjungtiva .....	53
2.1.11.3 Niche: microenvironment unik, mendukung quiescent sel punca limbal (LSC) .....	55
2.1.11.3.1 Identifikasi sel punca limbal (LSC) dan sel niche .....	57
2.1.11.3.2 Interaksi epitel-stromal dan microenvironment sel punca .....	58
2.1.11.4 Marker molekuler .....	61
2.1.11.4.1 Marker cytotkeratin .....	63
2.1.11.4.2 Faktor Transkripsi p63 .....	65
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>67</b>
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	67
3.2 Hipotesa penelitian .....	72
3.2.1 Sub hipotesa penelitian .....	72
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>74</b>





4.1	Rancangan Penelitian.....	74
4.2	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	75
4.3	Jumlah Sampel.....	75
4.4	Tempat dan Waktu Penelitian.....	76
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	76
4.6	Prosedur Penelitian.....	76
4.7	Analisa Data.....	76
4.7.1	Penelitian Tahap 1.....	77
4.7.2	Penelitian Tahap 2.....	78
4.7.3	Pembahasan Umum.....	78
4.8	Etika Penelitian.....	78
BAB 5	Penelitian Tahap 1: Pemeriksaan tes diagnostik Sindroma Dry Eye pada tikus model Ovariektomi.....	79
5.1	Pendahuluan.....	79
5.1.1	Latar Belakang.....	79
5.1.2	Rumusan Masalah.....	81
5.1.2.1	Sub Masalah.....	81
5.1.3	Tujuan Penelitian.....	82
5.1.3.1	Tujuan khusus.....	82
5.2	Kerangka Konsep Penelitian Tahap 1.....	83
5.3	Hipotesis Penelitian.....	84
5.3.1	Sub Hipotesis Penelitian.....	84
5.4	Metode Penelitian.....	84
5.4.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	84
5.4.2	Sampel Penelitian.....	85





5.4.3 Variabel Penelitian .....	85
5.4.4 Definisi Operasional .....	85
5.4.5 Alat/ Bahan Penelitian .....	86
5.4.5.1 Perawatan Tikus .....	86
5.4.5.2 Pembuatan Tikus Ovariektomi .....	86
5.4.5.3 Tes Schirmer .....	86
5.4.5.4 Tes Ferning .....	87
5.4.5.5 Tes FBUT .....	87
5.5 Alur Penelitian .....	88
5.6 Hasil dan Pembahasan .....	88
5.6.1. Hasil tes Schirmer .....	91
5.6.2. Hasil tes Ferning .....	96
5.6.3. Data hasil tes FBUT .....	101
5.7 Kesimpulan dan Saran .....	107
5.7.1. Kesimpulan .....	107
5.7.2. Saran .....	107
BAB 6 Penelitian Tahap 2: Pengaruh Genistein topikal pada Tikus Model Dry Eye dengan Ovariektomi Melalui Peran RE $\beta$ ; IL1 $\beta$ ; NF-kB pada Sel Epitel Konjungtiva; MUC5AC Sel Goblet Konjungtiva; p63 & N/C Rasio dan K12 & K13 Sel Punca Epitel Limbal .....	108
6.1 Pendahuluan .....	108
6.1.1 Latar Belakang .....	108
6.1.2 Rumusan Masalah .....	111
6.1.2.1 Sub Masalah .....	111
6.1.3 Tujuan Penelitian .....	112





6.1.3.1 Tujuan Khusus .....	112
6.2 Kerangka Konsep Penelitian Tahap 2 .....	114
6.3 Hipotesis Penelitian .....	115
6.3.1 Sub Hipotesis Penelitian .....	115
6.4 Metode Penelitian .....	116
6.4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	116
6.4.2 Sampel Penelitian .....	116
6.4.3 Variabel Penelitian 1 .....	116
6.4.4 Definisi Operasional .....	116
6.4.5 Alat/ Bahan Penelitian .....	118
6.4.5.1 Perawatan Tikus .....	118
6.4.5.2 Pembuatan Genistein Tetes Mata .....	118
6.4.5.3 Pengambilan bola mata .....	118
6.4.5.3.1 Alat/ Bahan .....	118
6.4.5.3.2 Metode .....	119
6.4.5.4 Pembuatan preparat jaringan .....	119
6.4.5.4.1 Pemeriksaan ekspresi RE $\beta$ , IL-1 $\beta$ , NF-kB, MUC5AC, K12, K13 dengan immunostaining .....	120
6.4.5.4.2 Pemeriksaan ekspresi p63 dengan immunostaining .....	122
6.4.6 Analisa Data .....	123
6.4.7 Diagram Alur Penelitian .....	124
6.5. Hasil penelitian tahap 2 .....	125
6.5.1 Pengaruh genistein terhadap ekspresi RE $\beta$ di nukleus sel epitel Konjungtiva .....	125
6.5.2 Pengaruh genistein terhadap ekspresi IL-1 $\beta$ di sel epitel	





Konjungtiva.....	129
6.5.3 Pengaruh genistein terhadap ekspresi MUC-5AC di sel goblet	
Konjungtiva.....	132
6.5.4. Pengaruh genistein terhadap ekspresi K12di sel punca epitel	
Limbal.....	135
6.5.5 Pengaruh genistein terhadap ekspresi K12di sel punca epitel	
Limbal.....	138
6.5.6. Pengaruh genistein terhadap ekspresi p63 di sel punca epitel	
Limbal.....	141
6.5.7. Pengaruh genistein terhadap ekspresi p 63 pada sel punca epitel	
limbal.....	144
6.6. Pembahasan.....	148
6.7. Kesimpulan dan Saran.....	157
6.7.1 Kesimpulan.....	157
6.7.2 Saran.....	157
BAB 7 Pembahasan Umum.....	159
BAB 8 Kesimpulan dan Saran.....	178
8.1 Kesimpulan.....	178
8.2 Saran.....	179
DAFTAR PUSTAKA.....	180





## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.Perbedaan kelenjar Lakrimal pada pria dan wanita.....	17
Tabel 2.2.Putative markers pada sel punca limbal (LSC).....	62
Tabel 5.1. Hasil Pemeriksaan Diagnostik SDE pada tikus model OVS .....	90
Tabel 5.2. Hasil tes Schirmer.....	91
Tabel 5.3. Uji Perbandingan Berganda Tukey untuk hasil tes Schirmer .....	92
Tabel 5.4. Urutan rata-rata hasil tes Schirmer sebagai efek perlakuan genistein .	94
Tabel 5.5. Data hasil tes Ferning .....	96
Tabel 5.6.Uji perbandingan berganda Tukey hasil Tes Ferning.....	98
Tabel 5.7.Urutan rata-rata hasil tes Ferning sebagai efek perlakuan genistein.....	99
Tabel 5.8.Data hasil tes FBUT.....	101
Tabel 5.9.Uji perbandingan berganda Tukey hasil tes FBUT.....	103
Tabel 5.10.Urutan rata-rata hasil tes FBUT sebagai efek perlakuan genistein.....	104
Tabel 6.1.Uji perbandingan berganda Tukey ekspresi RE- $\beta$ .....	127
Tabel 6.2.Urutan rata-rata RE- $\beta$ sebagai efek perlakuan genistein.....	128
Tabel 6.3.Uji perbandingan berganda Tukey ekspresi NF-kB.....	130
Tabel 6.4.Urutan rata-rata NF-kB sebagai efek perlakuan genistein.....	131
Tabel 6.5.Uji perbandingan berganda Tukey ekspresi IL-1 $\beta$ .....	133
Tabel 6.6.Urutan rata-rata IL-1 $\beta$ sebagai efek perlakuan genistein.....	134
Tabel 6.7.Uji perbandingan berganda Tukey ekspresi MUC-5AC.....	137
Tabel 6.8.Urutan rata-rata MUC-5AC sebagai efek perlakuan genistein.....	138
Tabel 6.9.Uji perbandingan berganda Tukey ekspresi K12.....	140
Tabel 6.10.Urutan rata-rata K12 sebagai efek perlakuan genistein.....	141







**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1. Etiologi mayor penyebab SDE.....	14
Gambar 2.2. Mekanisme core SDE.....	16
Gambar 2.3. Jalur syaraf yang menghubungkan tiap komponen dari unit fungsional lakrimal.....	18
Gambar 2.4. Skema pengaruh potensial estrogen terhadap aktivitas sitokin pro inflamasi.....	33
Gambar 2.5. Struktur asam amino RE.....	34
Gambar 2.6. Diagram skematik HSS melalui mekanisme genomic dan non genomic dalam sel.....	37
Gambar 2.7. Struktur kimia.....	38
Gambar 2.8. Berbagai jalur aksi fitoestrogen dalam merubah transkripsi gen.....	40
Gambar 2.9. NF- $\kappa$ B pathway pada permukaan mata.....	47
Gambar 2.10. Skema hipotesa sel punca limbal.....	52
Gambar 2.11 Niche sel punca epitel kornea/ limbal (LSC).....	57
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	67
Gambar 5.1. Kerangka Konsep Penelitian Tahap 1.....	83
Gambar 5.2. Alur Penelitian Tahap 1.....	88
Gambar 5.3. Ovariektomi.....	90
Gambar 5.4. Perbandingan rerata tes Schirmer pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	91
Gambar 5.5. Tes Schirmer.....	95
Gambar 5.6. Perbandingan rerata tes Ferning pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	95





kontrol.....	97
Gambar 5.7. Tes fering.....	100
Gambar 5.8. Perbandingan rerata tes FBUT pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	102
Gambar 5.9. Tes Fluoresin Break Up Time.....	106
Gambar 6.1. Kerangka Konsep Penelitian Tahap 2.....	114
Gambar 6.2. Diagram alur penelitian.....	124
Gambar 6.3. Ekspresi RE- $\beta$ di sel epitel konjungtiva.....	125
Gambar 6.4. Perbandingan rerata RE- $\beta$ pada kelompok perlakuan dan kontrol....	126
Gambar 6.5. Ekspresi NF-kB di sel epitel konjungtiva.....	129
Gambar 6.6. Perbandingan rata-rata NF-kB pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	129
Gambar 6.7. Ekspresi IL-1 $\beta$ di sel epitel konjungtiva.....	132
Gambar 6.8. Perbandingan rata-rata IL-1 $\beta$ pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	133
Gambar 6.9. Ekspresi MUC-5AC di sel goblet konjungtiva.....	135
Gambar 6.10. Perbandingan rata-rata MUC-5AC pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	136
Gambar 6.11. Ekspresi K12 di sel punca epitel limbal.....	139
Gambar 6.12. Perbandingan rata-rata K12 pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	139
Gambar 6.13. Ekspresi K13 di sel punca epitel limbal.....	142
Gambar 6.14. Perbandingan rata-rata K13 pada kelompok perlakuan dan kontrol.....	142





kontrol.....142

Gambar 6.15.Ekspresi p63 di sel punca epitel limbal.....145

Gambar 6.16. Perbandingan rata-rata p63 pada kelompok perlakuan dan kontrol.....148

Gambar 7.1.Diagram Jalur untuk t-statistik Hasil Output PLS menggunakan Software Smart PLS.....165





## DAFTAR SINGKATAN

NEI	: National Eye Institute
SDE	: Sindroma Dry Eye
TF	: Tear Film
IL	: Interleukin
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor $\alpha$
HSS	: Hormon Seks Steroid
RE	: Reseptor Estrogen
NFKB	: Nuclear Factor kappa B
K12	: Keratin 12
K13	: Keratin 13
USA	: United State of America
SS	: Sjogren Syndrome
NSSDE	: Non-Sjogren DE
MAP kinase	: Mitogen Activated Protein kinase
MMPs(MMP9)	: Matrix Metallo Proteinase
GF	: Growth Factor
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
KGF	: Keratocyte Growth Factor
EGF	: Epithelial Growth Factor
SOSD	: Symptomatic Ocular Surface Disease
SLE	: Systemic Lupus Erytmatous
TAF-1	: Transcription Activation Function
DNA	: Deoxyribonucleic Acid





E2	: 17 $\beta$ -estradiol
COX2	: cyclooxygenas
TSH	: Terapi Sulih Hormon
NO	: Nitric Oxide
NOS	: Nitric Oxide Synthase
eNOS	: endothelial NOS
nNOS	: neuronal NOS
iNOS	: inducible NOS
LOX	: Lipooxygenas
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor- $\beta$
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecules
ICAM-1	: Inter Cellular Adhesion Molecules
E-selectin	: Endothelial cell selectin.
BOB	: Blood-Ocular-Barrier
BRB	: Blood-Retinal-Barrier
AGE	: Advanced Glycation End product
LSC	: Limbal Stem Cell (Sel Punca Limbal)
PMC	: Post Mitotic Cells
TAC	: Transient Amplifying Cells
TDC	: Terminally Differentiated Cells
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
LSCD	: Limbal Stem Cell Defisiensi
ERE	: Estrogen Respon Element
OVX	: Ovariectomi
eTACs	: Transient Amplifying Cells









## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Berdasarkan National Eye Institute (1995), disebutkan bahwa keluhan penderita Sindroma Dry Eye (SDE) menempati urutan kedua sehingga datang berobat ke dokter mata. Karakteristik SDE berupa gejala iritasi okuler seperti ketidaknyamanan mata, kabur, terasa kering dan berpasir, mata lelah, panas, sakit, merah, silau, gatal, terdapat sekret mukus serta Tear Film (TF) yang tidak stabil, hiperosmolaritas airmata, dan *ocular surface epithelial disease*. Gangguan penglihatan yang berhubungan dengan gejala kekeringan dan ketidaknyamanan mata makin lama dapat mempengaruhi fungsi ketajaman penglihatan serta pekerjaan antara lain membaca, menggunakan komputer, berkendara, dan lain-lain sehingga menurunkan *quality of life*. Penyakit atau disfungsi dari kelenjar sekretori air mata menyebabkan disfungsi atau hilangnya sel yang bertanggung jawab terhadap sekresi atau retensi air mata sehingga terjadi perubahan komposisi air mata dan hiperosmolaritas yang merangsang produksi mediator inflamasi pada permukaan mata (Hodges, 2005; DEWS, 2007; De Paiva, 2008; Bhavsar, 2011).

Permukaan mata atau *ocular surface* berupa mukosa epitel khusus yang terdapat pada tiga regio berbeda yaitu konjungtiva, limbal korneoskleral dan kornea, sangat vital dan saling berhubungan dengan struktur adneksa dan peran kelopak mata, serta sistem lakrimal. Semua sistem komponen permukaan mata dan TF terintegrasi yang dihubungkan dengan inervasi, endokrin, vaskuler, sistem imun. Terjadinya malfungsi dari salah satu komponen, menyebabkan TF tidak stabil dan merubah komposisinya, sehingga terjadi inflamasi permukaan





mata yang mempunyai peran penting pada patogenesis SDE (Ilene, 2005; Barabino, 2012; American Academy of Ophthalmology 2014-2015).

Insidensi SDE banyak terjadi pada wanita, dengan faktor risikonya usia tua khususnya wanita pasca menopause, sehingga hormon berperan penting terhadap terjadinya SDE. Pemberian Hormon Replacement Therapy (HRT) pada SDE digunakan sebagai strategi untuk menurunkan gejala dan memperbaiki permukaan mata serta fungsi air mata, tetapi banyak penelitian yang hasilnya kontradiksi. Schaumberg *et al* (2001) melaporkan wanita yang menerima HRT dengan estrogen meningkatkan resiko SDE. Sedangkan penelitian lain Sator *et al* (1998) melaporkan bahwa dengan terapi (0,005 mg  $17\beta$  estradiol dalam 20 ml larutan; tetes mata, 6 jam sekali setetes perhari selama 4 bulan menunjukkan bahwa simptom okuler SDE dan hasil tes schirmer terdapat perbaikan bermakna.

Mohamed (2000) menyebutkan pada tikus ovariektomi 2 minggu dengan terapi  $17\beta$  estradiol didapatkan level RE mRNA meningkat dibanding dengan ovariektomi yang menunjukkan adanya regulasi RE-ligan. Hasil yang bertentangan ini kemungkinan tergantung dengan komposisi obat, cara pemberian, dosis estrogen, durasi dan usia. Hubungan antara SDE, HRT, dan usia masih belum dimengerti dengan baik. Belum ada konsensus yang jelas tentang proses seluler yang diregulasi oleh estrogen pada glandula lakrimal dan permukaan mata ( Sator *et al*, 1998; Mohamed, 2000; Schaumberg, 2001; Affinito, 2003; Pflugfelder, 2004; Versura, 2005; Darabad, 2014; Feng, 2016).

Pada wanita yang mengalami menopause, baik secara alami maupun operatif, terjadi peningkatan ekspresi dan sekresi sitokin proinflamasi, yaitu IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ , dimana peningkatannya serupa dengan yang terjadi pada reaksi host terhadap infeksi atau kerusakan jaringan. Defisiensi estrogen juga dapat meningkatkan respon sel terhadap beberapa sitokin melalui peningkatan





jumlah reseptor sitokin, sehingga pemberian estrogen diharapkan dapat menurunkan aktivitas sitokin ( Fuchsjager, 2002; Pfeilschifter, 2002; Suzuki, 2006).

Menopause ditandai dengan adanya perubahan level Hormon Sex Steroid (HSS) yaitu penurunan produksi hormon estrogen dan androgen. Mata merupakan target organ HSS. Reseptor Estrogen (RE) antara lain terdapat pada epitel konjungtiva dan kornea, kelenjar lakrimal dan meibom. Epitel konjungtiva bersifat estrogen sensitiv. Gupta (2005) dan beberapa literatur menyebutkan bahwa RE yang ditemukan pada permukaan mata menunjukkan kemungkinan adanya efek positif estrogen dalam memperbaiki fungsi air mata, sehingga berperan pada homeostasis dan fungsi permukaan mata. Dari uraian tersebut diduga terdapat peran RE pada onset terjadinya SDE (Pflugfelder, 2004; Gupta, 2005; Hutchinson, 2014).

Pada SDE terputusnya *tight junction* pada epitel kornea apikal dan konjungtiva terjadi karena aktivasi stres yang berhubungan dengan faktor transkripsi seperti NF-kB dan AP-1. Hal ini karena NF-kB sebagai regulator utama dalam respon inflamasi, sehingga aktivitas NF-kB dan ekspresi sitokin proinflamasi meningkat. Pflugfelder (2004) dan berbagai literatur menyatakan bahwa inflamasi konjungtiva terjadi lebih dari 80% penderita SDE. Epitel konjungtiva merupakan sumber peningkatan konsentrasi IL-1 $\beta$  dan memiliki peranan penting dalam patogenesis SDE. Selanjutnya terjadi perubahan patologi dengan keadaan hiperproliferasi dan diferensiasi epitel konjungtiva, terdapat perubahan komposisi kuantitas dan biokimia dari lapisan musin, sehingga konsentrasi rata-rata sel goblet mensekresi musin solubel MUC5AC menurun. Hilangnya sel goblet yang merupakan gambaran bentuk SDE, konsisten dengan





adanya penurunan level gel musin MUC5AC (Solomon, 2001; Sthal, 2003; Narayanan, 2006; Sarkar, 2008; Dartt, 2014).

Hasil tinjauan pustaka Girolamo (2011) mengemukakan bahwa limbal, fornix dan beberapa area konjungtiva bulbi mengandung sel punca. Limbal merupakan sel progenitor yang mempunyai respon terhadap homeostasis; sumber utama regenerasi sel epitel kornea dan sel epitel konjungtiva selain itu sebagai suatu barrier antara epitel kornea dan epitel konjungtiva. Sel punca yang multipoten berperan penting dalam genesis dan diferensiasi seluler, perkembangan jaringan, dan organogenesis. Hasil studi Beyazyildiz (2014) diketahui bahwa fungsi reseptor nuklear seperti RE meregulasi *stemness* atau diferensiasi sel punca. Hasil penelitian experimental model SDE disimpulkan bahwa sel punca telah menunjukkan efek anti inflamasi dan telah sukses digunakan untuk terapi berbagai macam penyakit karena mempunyai potensial diferensiasi luas, anti inflamasi, dan efek imunomodulator (Ang, 2004; Rauz, 2010; Girolamo, 2011; Beyazyildiz, 2014).

Sindroma Dry Eye berupa peradangan kronis permukaan mata dan terjadi gangguan imunohomeostasis, sehingga dapat mengakibatkan pengaruh negatif terhadap pemeliharaan, fungsi sel punca limbal. Pada inflamasi didapatkan perubahan patologi struktur anatomi dan *marker* dari niche sel punca limbal. Sedangkan p63 spesifik dalam mengidentifikasi sel punca limbal, karena tidak didapatkan di sel epitel kornea, hanya ada pada lapisan basal limbal, terutama pada keadaan *resting healthy* limbus, sehingga ekspresi p63 merupakan suatu *marker* yang tepat untuk sel punca epitel (Ang, 2004; Arpitha, 2008; Bhavsar, 2011; Jerome, 2011).

Inflamasi kronis pada permukaan mata pada SDE mengaktifasi gen yang respon terhadap diferensiasi, seperti keratin. Hiperkeratinisasi epitel konjungtiva





dan kornea menghasilkan permukaan yang tidak *wettable* dan lubrikasi yang jelek. Adanya peningkatan inflamasi yang terus menerus dan penurunan produksi airmata, maka terjadi perubahan patologi dengan keadaan hiperproliferasi dan diferensiasi epitel konjungtiva. Miranda (2011) menyebutkan bahwa ekspresi sitokeratin K13 dan K12 terdapat pada permukaan mata. Oleh karena itu, pemeriksaan *marker* K13 dan K12 sel punca pada epitel konjungtiva, kornea dan limbal sangat diperlukan (Ganji, 2005; Miranda, 2011).

Aspek terapi SDE sebagian besar untuk meningkatkan volume air mata dengan menggunakan *artificial tears* yang bersifat paliatif, hanya meringankan gejalanya tanpa memperbaiki proses penyebab penyakitnya. Saat ini terdapat berbagai terapi anti inflamasi pada SDE seperti autolog serum, kortikosteroid, agen imunomodulator, suplemen asam lemak, suplemen androgen, dan antibiotika oral yang hasilnya menjanjikan, tetapi respon klinis terhadap terapi ini waktu penggunaannya lama, terus menerus, non spesifik, spektrum luas dan terjadi efek samping. Terapi anti inflamasi memberikan hasil lebih baik dibandingkan dengan terapi alternatif lainnya. Proses inflamasi berperan penting pada SDE, dan *marker* inflamasi telah banyak ditemukan pada epitel konjungtiva, kornea, dan limbal sehingga keadaan ini memicu terhadap perkembangan terapi SDE. Oleh karena itu, terapi SDE masih diperlukan target obat anti inflamasi walau penggunaannya jangka panjang, tetapi aman sehingga dengan adanya strategi yang baru dalam terapi, harapannya lebih efektif dalam mengontrol gejala SDE dan komplikasi yang ditimbulkannya (Gayton, 2009; Phadataré, 2015; Beyazyildiz, 2014; Jones, *et al* 2017).

Genistein merupakan estrogen lemah yang menunjukkan efek estrogenik poten pada keadaan estrogen berkurang. Genistein merupakan komponen biologis aktif pada tumbuhan yang struktur kimia dan fungsinya serupa dengan





17- $\beta$  estradiol, berikatan dengan RE, afinitas ikatan genistein lebih besar pada RE $\beta$  dibanding RE $\alpha$ . Telah diprediksi bahwa pada wanita menopause, genistein menunjukkan sebagai bahan estrogenik yang besar. Estrogen endogen dan genistein saling membantu dalam efek penghambatan ekspresi sitokin. Gadgeeel (2009) menyebutkan bahwa genistein 12,5 -37,5 $\mu$ M, 3x sehari selama 3 hari didapatkan NF-kB yang menurun. Li (2014) menguraikan bahwa genistein 20  $\mu$ M menurunkan produksi mediator inflamasi IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 pada sel MH7A yang diaktivasi TNF  $\alpha$ . Schalch (2010) menyimpulkan bahwa terapi genistein oral 50 dan 250 ppm pada SDE dengan tikus *induced* scopolamin dapat meningkatkan volume air mata dan memperbaiki sel goblet. Selain itu dari berbagai literatur genistein mempunyai peran dalam menghambat inflamasi melalui *pathway* NF-kB, aktivasi Akt, MAPK, IGF-1, estrogenik dan non estrogenik (Cooke, 2006; Sarkar, 2008; Moreira, 2014).

Dari uraian tersebut di atas, hal ini mendorong untuk melakukan penelitian pengaruh genistein topikal pada SDE, melalui peran RE $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal sehingga harapan di masa mendatang peran genistein dapat menjadi bahan pertimbangan sebagai target strategi terapi SDE yang valid dalam menghambat inflamasi dan dapat digunakan membantu mengetahui keparahan, diagnostik SDE atau sebagai terapi sel punca limbal pada kelainan permukaan mata. Diharapkan penelitian ini akan menghasilkan konsep baru pada terapi dan patomekanisme terhadap pengaruh genistein pada SDE dengan tikus model ovariektomi melalui studi *in vivo*, serta patobiomolekuler melalui peran sel epitel & sel goblet konjungtiva serta sel punca epitel limbal.





## 1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dirumuskan masalah sebagai berikut:

Apakah genistein topikal berpengaruh terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi melalui peran  $RE\beta$ , NF- $\kappa B$ , IL- $1\beta$ , sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal?

### 1.2.1 Sub masalah

Berdasarkan permasalahan di atas, dirumuskan sub masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan ekspresi seluler  $RE\beta$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi seluler NF- $\kappa B$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal?
3. Apakah terdapat perbedaan ekspresi seluler IL- $1\beta$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal?
4. Apakah terdapat perbedaan ekspresi seluler MUC5AC sel goblet konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal?
5. Apakah terdapat perbedaan ekspresi seluler K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal?
6. Berapa dosis genistein topikal yang berpengaruh pada SDE dengan tikus model ovariektomi terhadap ekspresi seluler  $RE\beta$ , NF- $\kappa B$ ; dan IL- $1\beta$  pada





sel epitel konjungtiva; MUC5AC pada sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh genistein topikal terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi melalui peran RE  $\beta$ ; NF-kB; IL1  $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal.

#### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi seluler RE  $\beta$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
2. Untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi seluler NF-kB sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
3. Untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi seluler IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
4. Untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi seluler MUC5AC sel goblet konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
5. Untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi seluler K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.





6. Untuk mengetahui berapa dosis genistein topikal yang berpengaruh pada SDE dengan tikus model ovariektomi melalui ekspresi seluler RE $\beta$ ; NF-kB; dan IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal.

#### 1.4 Manfaat penelitian

##### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Menambah pengetahuan tentang adanya pengaruh genistein topikal terhadap etio-patomekanisme SDE melalui peran RE $\beta$ ; NF-kB; IL1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal.

##### 1.4.2 Manfaat Klinis

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pendekatan terapi baru anti inflamasi baik melalui peran, dosis, dan lamanya pemberian genistein topikal pada SDE. Pemeriksaan *marker* molekuler sel punca limbal dimasa mendatang nantinya dapat digunakan sebagai kit diagnostik dan pendekatan terapi SDE dengan keterlibatan limbal. Harapannya dapat sebagai pencegahan, menghambat keparahan, serta deteksi dini SDE, sehingga keluhan penderita SDE yang mengganggu faktor kenyamanan dan *quality of life* serta menempati urutan kedua terbanyak datang berobat ke dokter mata dapat ditekan.





## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Sindroma *Dry Eye* (SDE)

Pada tahun 1995 menurut *National Eye Institute* (NEI), Sindroma *Dry Eye* (SDE) atau *Dry Eye Syndrome* atau *Keratoconjunctivitis Sicca* merupakan kelainan lapisan air mata atau *Tear Film* (TF) akibat defisiensi atau evaporasi airmata yang meningkat, sehingga menyebabkan kerusakan permukaan mata interpalpebra. Selain itu berhubungan dengan gejala kekeringan serta ketidak nyamanan mata (Gulati, 2005; Lemp, 2005; Johnston, 2012).

Saat ini telah diakui bahwa permukaan mata dan kelenjar yang mensekresi airmata ditetapkan sebagai unit fungsional lakrimal terintegrasi dan kompleks yang dihubungkan oleh persarafan autonom dan sensori. Unit fungsional ini mempertahankan kesehatan dan mensupresi inflamasi permukaan mata dengan reflek terhadap komposisi TF dan penjernihan airmata permukaan mata (Beuerman, 2004; DEWS, 2007).

Disfungsi dari beberapa sub bagian unit fungsional lakrimal akan menghasilkan perubahan komposisi TF tidak stabil, sehingga tidak mendukung fungsi normal permukaan mata. Misalnya, bila osmolaritas airmata meningkat, maka tampak mediator proinflamasi dan protease dalam TF, secara umum hal ini berhubungan dengan gangguan permukaan mata, dan berakibat tidak baik pada jaringan kornea dan konjungtiva. Adanya inflamasi permukaan mata, maka bersamaan itu pula terdapat disfungsi unit fungsional lakrimal yang selanjutnya terjadi ketidakstabilan TF, sehingga menyebabkan gangguan epitel, dan





menstimulasi ketidaknyamanan (*discomfort*). Disfungsi primer beberapa komponen unit fungsional lakrimal menyebabkan terjadi transfer sekunder keseluruhan sistem melalui hubungan neural. Pada konsep inilah yang dilaporkan dan telah diamati oleh berbagai sub kelompok SDE dalam skema NEI terdapat tumpang tindih pada gambaran klinisnya. Telah dikemukakan definisi SDE yang lebih luas yaitu suatu kelainan dimana terjadi disfungsi unit fungsional lakrimal, menyebabkan TF tidak stabil yang meningkatkan inflamasi permukaan mata, gangguan epitel, dan gejala *discomfort* (Pflugfelder, 2004; DEWS, 2007; Perry, 2008)

### 2.1.1. **Dry Eye: Sindroma inflamasi pada permukaan mata atau *Ocular Surface* (OS)**

Hal yang terpenting pada inflamasi permukaan mata adalah terjadi ketidakstabilan TF sebagai akibat disfungsi unit fungsional lakrimal yang terintegrasi. Kegagalan TF akan mendorong terjadinya konstelasi inflamasi permukaan mata yang melibatkan seluler dan mediator solubel. Pada dasarnya reaksi imun ini yang mendasari dan mempunyai peran penting pada SDE terhadap gangguan saraf sensori pada epitel kornea, sehingga hal ini berperan pada ketidaknyamanan mata. Inflamasi mempunyai peran kunci pada patogenesis SDE. Selanjutnya pada SDE tidak hanya defisiensi salah satu komponen TF tetapi bisa lebih, seperti pada skema klasifikasi menurut NEI (Pflugfelder, 2004; Gulati, 2005; DEWS, 2007; Bron, et al, 2017).

Berdasar pengetahuan SDE, maka lebih tepat untuk mempertimbangkan sebagai sindroma inflamasi pada permukaan mata daripada insufisiensi TF yang simpel, karena tanda keratokonjungtivitis sicca yang telah digunakan pada dekade lampau menguraikan bahwa gangguan permukaan mata dapat berkembang menjadi





SDE, dengan menggunakan definisi yang telah diakui berdasar etiologi inflamasi.

Definisi SDE yang lebih luas, lebih tepat untuk menguraikan inflamasi permukaan mata berkembang dari kegagalan TF. Konsep yang lebih terpadu inilah yang digunakan. Berdasar konsensus grup *The Delphi panel* (2007) mengusulkan perubahan nama dari *dry eye disease* menjadi *dysfunctional tear syndrome*, karena

lebih akurat dalam merefleksikan patofisiologi SDE, tetapi disimpulkan bahwa retensi nama SDE lebih banyak direkomendasikan dan digunakan pada literatur, berdasar hal ini sehingga pada penulisan selanjutnya disebut SDE (Gulati, 2005; DEWS, 2007; Perry, 2008).

### 2.1.2. Epidemiologi SDE

Berdasarkan NEI (1995), disebutkan bahwa keluhan penderita SDE merupakan penyebab utama yang membawa penderita datang berobat ke dokter. Schaumberg, et al., (2003) melaporkan bahwa prevalensi SDE di USA meningkat dengan bertambahnya usia dari 5,7% pada wanita < 50 tahun, 7,8% wanita usia > 50 tahun, 9,8% pada wanita > 75 tahun. Dari hasil penelitian Lee, et al (2002) di Propinsi Riau menetapkan bahwa prevalensi gejala SDE berdasar usia >21 tahun 27,5%. Rusdianto, dkk (2004) menulis angka kejadian SDE di Poli Mata RS Palembang, April–September 2003 sebesar 8,3% (Lee, 2002; Schaumberg, 2003; Rusdianto, 2004; Anshu, 2005).

Schaumberg, et al., (2001) dalam *women's health study* prevalensi SDE pada wanita paska menopause yang menggunakan estrogen 66–70%. Menurut hasil survei dari *Society for Women's Health Research* (2006) menunjukkan bahwa 62% wanita menopause dan perimenopause menderita SDE, dan 59% nya datang menemui dokter karena SDE yang dikeluhkannya. Prevalensi SDE bervariasi hal ini





karena kriteria obyektif dan subyektif dalam mendefinisikan SDE berbeda (Schaumberg, 2001; Versura, 2005).

Hasil studi melaporkan 60% dari penderita SDE (N=74) berobat ke dokter, 64% dari penderita menggunakan *artificial tears* reguler, >40% dilakukan oklusi punctum, 30% menggunakan terapi analgesik, antibiotika, dan anti inflamasi yang meredakan simtomnya. Disamping masalah terapi, >76% penderita SDE mempunyai simtom masih sama atau lebih berat daripada tahun sebelumnya. Pada penderita pekerja, simtom SDE mengganggu dan rata-rata dari 186 hari pertahun, perkiraan biaya dari hilangnya produktivitas > \$5000 pertahun. Dari studi lain, pada populasi SDE usia >65 tahun (N=2520), 14,6% sering mengalami simtom lebih dari sekali, atau sepanjang waktu; 25% menggunakan *artificial tears* atau lubrican dan 73% berkunjung ke dokter selama setahun sebelumnya. Hasil terapi tersebut menunjukkan tidak adekuat, sehingga agen terapi untuk penderita SDE masih sangat luas untuk diteliti (Pflugfelder, 2004).

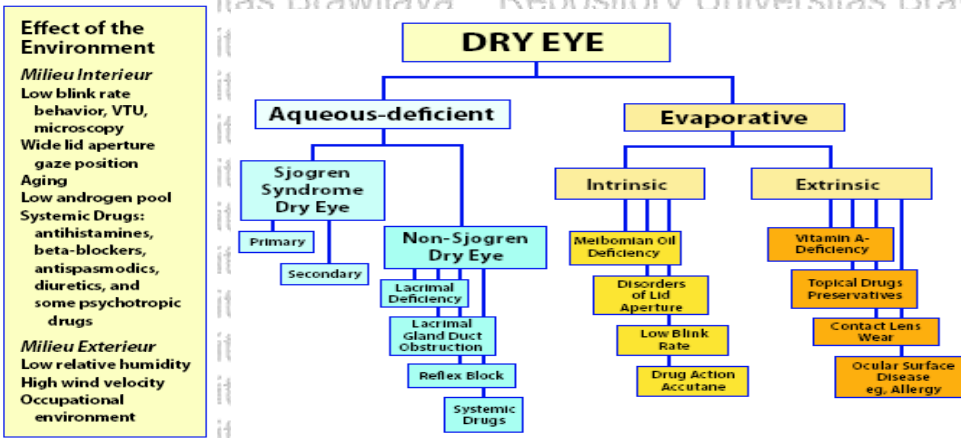
### 2.1.3. Klasifikasi: Etiologi mayor SDE

Pada SDE dapat diklasifikasi menjadi 2 kelompok, yaitu tipe defisiensi air mata, dimana terjadi defisiensi sekresi akuos, dan tipe evaporatif yang disebabkan karena evaporasi air mata yang berlebihan. Tipe defisiensi air mata dibagi lagi menjadi 2 kelompok, yaitu Sjogren Syndrome (SS) yang berhubungan dengan penyakit autoimun, dan Non-Sjogren SDE (NSSDE) yang tidak berhubungan dengan penyakit autoimun. Tipe Non Sjogren merupakan tipe yang terbanyak, meliputi 2/3 bagian bentuk SDE. Masing-masing tipe SDE memiliki gambaran umum yang sama, yaitu adanya gejala khas berupa kerusakan permukaan mata, penurunan stabilitas





air mata, dan hiperosmolaritas air mata (Pflugfelder, 2004; DEWS, 2007; Perry, 2008).



**Gambar 2.1. Etiologi mayor penyebab SDE.** Pada hand box kiri menggambarkan pengaruh resiko environment dari individu yang berkembang SDE. Environment digunakan secara luas, termasuk kebiasaan individu, merefleksikan milieu interieur atau hasil paparan kondisi eksternal milieu exterieur. Gambar ini berpengaruh terhadap onset dan tipe SDE, yang terbagi menjadi SDE defisiensi akuos atau evaporatif (DEWS, 2007).

**2.1.4. Mekanisme SDE**

Hiperosmolaritas airmata menyebabkan kerusakan epitel permukaan dengan mengaktivasi cascade inflamasi permukaan mata dan mediator inflamasi yang terlepas masuk airmata. Kerusakan epitel melibatkan kematian sel dengan apoptosis, hilangnya sel goblet, dan gangguan ekspresi musin yang menyebabkan TF tidak stabil. Hal ini memperberat hiperosmolaritas permukaan mata, dan terjadi *cyrcle vicious* secara lengkap. Jika TF tidak stabil, dapat terjadi SDE tanpa diawali hiperosmolaritas air mata, seperti pada xerophthalmia, alergi okuler, preservative topikal, dan pemakai lensa kontak. Luka epitel yang disebabkan SDE menstimulasi kornea *nerve ending*, sehingga terjadi gejala ketidaknyamanan, frekwensi kedip meningkat, dan terjadi kompensasi reflek lakrimal yang mensekresi air mata.



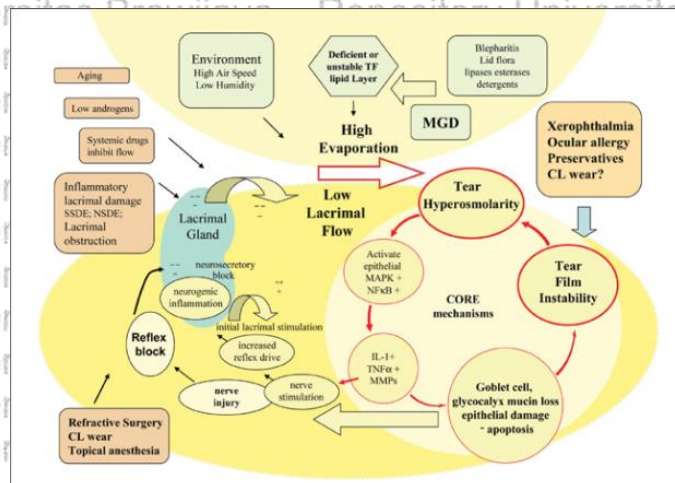


Hilangnya musin pada permukaan mata berkontribusi terhadap SDE dengan ditandai meningkatnya resistensi friksi antara kelopak dan bola mata. Selama periode ini, reflek input yang meningkat menyebabkan inflamasi neurogenik pada kelenjar lakrimal (Pflugfelder, 2004; DEWS, 2007).

Penyebab utama hiperosmolaritas air mata yaitu aliran akuos air mata yang menurun, akibat dari gagalnya lakrimal dan/atau peningkatan evaporasi TF. Kelembaban rendah dan aliran udara tinggi meningkatkan hilangnya evaporasi, secara klinis terjadi disfungsi kelenjar meibom yang mengakibatkan lapisan lipid TF tidak stabil. Aliran air mata akuos yang menurun mengakibatkan kegagalan mengalirnya cairan lakrimal masuk saku konjungtiva. Pada Gambar 2.1 di atas yang tidak jelas adalah proses normal *aging*. Penyebab utama SDE adalah inflamasi karena kerusakan lakrimal yang tampak pada kelainan autoimun SS dan NSSDE. Inflamasi menyebabkan destruksi jaringan dan berpotensi blokade neurosekretori yang reversibel. Suatu blokade reseptor juga disebabkan oleh sirkulasi antibodi terhadap reseptor M3. Inflamasi juga terjadi pada jaringan dengan level androgen yang rendah (Pflugfelder, 2004; Bhavsar, 2011; *American Academy of Ophthalmology*, 2014-2015).

Aliran air mata mengalami obstruksi pada *cicatricial conjunctival scarring* atau hilangnya reflek sensori kelenjar lakrimal. Bahkan, kerusakan permukaan yang kronis pada SDE menyebabkan menurunnya sensitivitas kornea dan reflek sekresi air mata. Penyebab SDE yang sering terjadi merupakan interaksi beberapa mekanisme (DEWS, 2007; *American Academy of Ophthalmology*, 2014-2015).





**Gambar 2.2. Mekanisme core SDE.** Mekanisme core SDE terjadi karena hiperosmolaritas air mata dan ketidakstabilan TF. (*American Academy of Ophthalmology, 2014-2015*).

#### 2.1.4.1. Perbedaan Gender pada Kelenjar Lakrimal

Sebagian besar penderita SDE adalah wanita. Hal ini ditengarai karena perbedaan kelenjar lakrimal antara pria dan wanita. Sebagaimana telah diteliti sebelumnya pada berbagai spesies, didapatkan beberapa perbedaan yang cukup signifikan dalam hal profil struktur, kapasitas fungsional, aktifitas sekresi, dan penyakit yang menyertai. Salah satu contohnya adalah Sjörger Syndrome, dimana 90% penderitanya adalah wanita. Selain itu, perbedaan signifikan juga terdapat pada kelenjar meibom, dimana level lipid yang diproduksi pada usia pubertas sampai dengan 50 tahun, didapatkan hasil laki-laki lebih tinggi dibandingkan pada wanita. Atas dasar hal inilah, maka salah satu hipotesa tentang SDE didasarkan pada jenis kelamin. Pada tabel berikut dijelaskan lebih detail mengenai perbedaan kelenjar lakrimal pada laki-laki dan perempuan (Draper, 1999; Pflugfelder, 2004; Gulati, 2005). **Tabel 2.1 Perbedaan kelenjar Lakrimal pada pria dan wanita** (Pflugfelder, 2004; Gulati, 2005)





Pria	Wanita
<b>Tampilan Morfologi</b>	
Kelenjar acini besar, iregular denga lumina yang lebar.	Kelenjar acini kecil, regular dengan lumina yang sempit.
Pembatas sel acinar tidak jelas.	Batas sel acinar jelas dan berlobus.
Sitoplasma sel epitel lebih keruh dengan sedikit granular basofil.	Sitoplasma sel epitel lebih jernih dengan granular ba-sofil yang lebih pekat, terutama daerah sekitar nukleus.
Nukleus terletak disentral dengan bentuk & ukuran yang bervariasi. Didapatkan banyak nukleus poliploid dan beberapa sel menunjukkan adanya nukleolus.	Nukleus terletak dibasal Dengan bentuk & ukuran seragam.
Didapatkan beberapa vakuola dengan banyak intranuclear inclusion pada sel aciner.	Banyak didapatkan vesikel berukuran besar pada sitoplasma.
Jarang didapatkan kanal-kanal intraseluler. Didapatkan struktur khusus yang disebut <i>Golgi fields</i> .	Banyak didapatkan kanal-kanal intraseluler.
<i>Capillary endothelial</i> hanya memiliki beberapa pori-pori. Peningkatan indeks labeling menunjukkan <i>turn over</i> sel yang menurun seiring pertambahan usia. Pada usia tua didapatkan lobus-lobus fibrosis dan atrofi yang terlokalisir.	<i>Capillary endothelial</i> umumnya memiliki pori-pori. Pada usia tua didapatkan fibrosis dan atrofi yang tersebar.
<b>Molekular, Fisiologi dan Karakteristik Sistem Imun</b>	
Banyak didapatkan berbagai jenis mRNA (antara lain: $\alpha 2u$ -globulin, komponen sekresi, cystatin-related protein, TGF- $\beta 1$ , Fas antigen dan mRNA protein urin tikus)	Banyak didapatkan berbagai jenis mRNA (antara lain: bcl-2, c-myc, c-myb, p53, reseptor androgen, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dan mRNA pancreatic lipase; beberapa perbedaan berhubungan dengan strain)
Banyak didapatkan sekresi berbagai jenis protein (antara lain: reseptor androgen dan komponen skresi)	Banyak didapatkan sekresi berbagai jenis protein (antara lain: melatonin, protein 20-kDa, dan N-acetyltransferase seperti leucine aminopeptidase setelah pubertas)
Memiliki sejumlah besar reseptor $\beta$ -adrenergic dengan afinitas yang besar.	Memiliki aktifitas yang tinggi khususnya pada Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase, reseptor cholinergic, acid & alkaline phosphatase, serta galactosyltransferase.
Aktivitas hydroxyindole-o-methyltransferase dan carbonic anhidrase yang lebih tinggi.	Aktivitas peroksidase yang lebih tinggi.
Terdapat peningkatan jumlah dari sel yang mengandung IgA setelah pubertas.	Memiliki kepekaan yang tinggi untuk invasi dan replikasi cytomegalovirus. Memiliki insiden focal adenitis yang lebih tinggi. (terutama utk wanita >45 tahun) Memiliki insiden tinggi untuk terjadinya penyakit autoimmune.
<b>Aktivitas Sekresi dan Komponen Tear Film</b>	
Sekresi lebih tinggi untuk beberapa jenis protein (antara lain: IgA, cystatin-related protein, protein 42-kDa dan 46-kDa)	Sekresi lebih tinggi untuk beberapa jenis protein (antara lain protein 90-kDa dan 20-kDa)
Sekresi lebih tinggi untuk phenylephrine-induced peroxidase serta total protein invitro. Banyak memiliki EGF, TGF- $\alpha$ dan genSDEr-spesific protein air mata.	
Memiliki osmolalitas air mata yang tinggi pada usia <41 tahun.	Memiliki nilai Tear Break Up Time yang lebih rendah dan terdapat peningkatan osmolalitas seiring pertambahan usia. Memiliki prevalensi lebih tinggi untuk kejadian defisiensi air mata. Memiliki prevalensi tinggi untuk terjadinya sindrom mata kering.

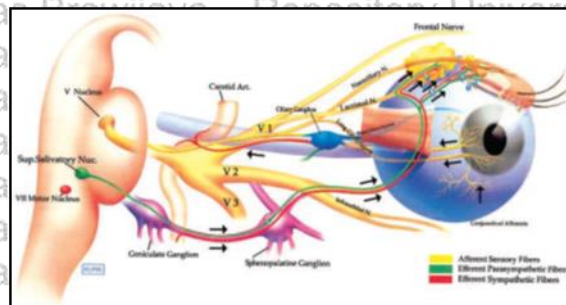




#### 2.1.4.2. Unit Fungsional Lakrimal: Suatu Mekanisme Homeostatis

Unit fungsional lakrimal merupakan perpaduan dari kelenjar lakrimal bersama-sama dengan jaringan permukaan mata, antara lain kelenjar lakrimal asesori, konjungtiva dan kelopak mata; korneal limbal; serta kelenjar meibom, yang berfungsi menghasilkan dan memelihara lapisan TF. Konsep dari unit fungsional lakrimal ini adalah bersama-sama bertindak untuk melindungi permukaan mata sekaligus mengontrol keadaan lingkungan permukaan mata. Kumpulan serabut saraf kompleks yang terdiri dari sensoris, simpatis dan parasimpatis, menghubungkan antar tiap-tiap komponen dari unit fungsional lakrimal sehingga menciptakan siklus homeostatis yang menjaga serta melindungi permukaan mata. Jaringan dan saraf yang menginervasi dapat dikelompokkan menurut fungsi, antara lain: kornea, yang menyediakan input sensoris bagi unit fungsional lakrimal; kelenjar lakrimal yang selain memiliki fungsi sekresi, juga memiliki ketiga jenis jaringan saraf.

Salah satu serabut saraf adalah serabut saraf nyeri, dimana berdasarkan observasi klinis, terbukti berperan dalam mengontrol aliran air mata (Tsubota, 2003; Beuerman, 2004; DEWS, 2007).



**Gambar 2.3 Jalur saraf yang menghubungkan tiap komponen dari unit fungsional lakrimal (Beuerman, 2004).**





#### 2.1.4.3. Hiperosmolaritas Air Mata

Hiperosmolaritas air mata merupakan mekanisme sentral yang menyebabkan inflamasi, kerusakan, simptom permukaan mata dan mengawali peristiwa kompensasi pada SDE. Hiperosmolaritas air mata, hasil dari evaporasi dari paparan permukaan mata pada keadaan aliran air mata akuos yang rendah, atau akibat evaporasi yang berlebihan. Hiperosmolaritas akan menstimulasi *cascade* inflamatori pada sel epitel permukaan, yang meliputi MAP kinase; sinyal *pathway* NFkB dan sitokin inflamasi (IL-1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ); MMPs(MMP9), yang berasal dari atau aktivasi sel inflamatori pada permukaan mata. Inflamatori dapat menyebabkan apoptosis sel epitel permukaan, termasuk sel goblet; sehingga hilangnya sel goblet secara langsung berhubungan dengan efek inflamasi kronis. Hilangnya sel goblet merupakan gambaran bentuk SDE, yang konsisten dengan adanya penurunan level gel musin MUC5AC pada SDE (Beurman, 2004; Narayanan, 2006; DEWS, 2007).

#### 2.1.4.4. Ketidakstabilan *Tear Film* (TF)

*Tear Film* (TF) normal diperlukan untuk mempertahankan fungsi permukaan mata. Perubahan patologi pada SDE yang mengenai semua komponen TF merubah *environment* permukaan mata, dari permukaan mata suportif ke pro inflamatori. Telah diketahui TF mempunyai 4 fungsi penting yaitu: permukaan optik yang halus rata untuk penglihatan normal, mempertahankan kenyamanan, proteksi terhadap *environment* dan infeksi, mempertahankan sehatnya sel epitel. Perubahan fungsi TF akan menghasilkan gangguan penglihatan, iritasi, inflamasi dan infeksi. Kornea merupakan permukaan tubuh dengan inervasi padat. Bila epitel kornea terganggu menyebabkan proses akut, dan rasa sakit. Ketika permukaan mata mengalami iritasi





konstan, stimulasi konstan pada *nerve ending* sensori akan melepaskan neuropeptida, seperti substansi P dan calcitonin gene-related peptide (CGRP), yang mampu menyebabkan inflamasi neurogenik. Hal ini menjadi faktor awal penting pada patogenesis SDE. Bila tidak dicegah, stimulasi lingkungan akan konstan dan meningkatkan permukaan *shear forces* sehingga menyebabkan iritasi berlanjut, epitel permukaan mata mengelupas tidak normal, dan hiperemia pembuluh darah konjungtiva. Inflamasi diawali dengan protein darah dan sel imun bocor dari pembuluh darah masuk ke substansia propria konjungtiva. Inflamasi kronis permukaan mata mengaktifkan gen yang mempunyai respon terhadap diferensiasi, salah satu contohnya keratin. Hiperkeratinisasi epitel konjungtiva dan kornea menghasilkan permukaan yang tidak *wettable* dan lubrikasi yang jelek, menghasilkan peningkatan inflamasi dengan siklus yang terus menerus dan menurunkan produksi air mata (Pflugfelder, 2004; Barabino, 2012).

Komponen pada SDE awalnya terjadi TF yang tidak stabil dalam bentuk TF *break up* yang merupakan predisposisi terjadinya SDE. Hal ini akibat respon terhadap stress permukaan mata. Pada interval kedip terjadi TF tidak stabil yang menggambarkan TF *break up*. Kekeringan lokal dan hiperosmolaritas permukaan yang terpapar, berakibat kerusakan epitel permukaan, dan terjadi gangguan *glycocalyx* dan musin sel goblet. Akibatnya terjadi eksaserbasi TF yang tidak stabil dan merupakan bagian *vicious circle* (Pflugfelder, 2004; Barabino, 2012).

#### 2.1.4.5. Struktur dan stabilitas Tear Film (TF)

Struktur TF untuk mempertahankan kestabilan lingkungan yang mendukung permukaan mata. Struktur TF terdiri dari 3 komponen: lapisan musin yang melapisi





epitel permukaan, lapisan akuos yang menyusun mayoritas TF, dan lapisan lipid yang tipis terletak di paling atas dan memperlambat evaporasi (Pflugfelder, 2004; Hodges, 2005; *American Academy of Ophthalmology*, 2014-2015).

#### **2.1.4.5.1. Lapisan Musin**

Berfungsi sebagai surfaktan permukaan mata, menyebarkan TF sampai membasahi epitel hidrofobik. mempunyai respon terhadap viskositas TF, proteksi terhadap kedipan dengan *shear force* yang berakibat menyebabkan sel epitel mengelupas, iritasi permukaan mata, dan bahkan inflamasi. Lapisan musin juga membantu mempertahankan refraktif power dan optikal permukaan mata. Dikemukakan bahwa lapisan musin secara umum berfungsi untuk mencegah aderen sel inflamasi, bakteri, atau debris pada permukaan mata (Berry, 2008; Corrales, 2011, Dartt, 2014).

##### **2.1.4.5.1.1. Struktur dan fungsi sel goblet konjungtiva**

Konjungtiva terdiri dari dua tipe sel mayor, yaitu sel goblet dan sel skuamosa stratifikasi. Sel goblet dapat terjadi tunggal atau dalam kelompok dan dikelilingi oleh sel skuamosa stratifikasi. Kedua tipe sel tersebut berbeda pada tipe musin dan dilepas ke dalam TF. Sel skuamosa stratifikasi mensintesa membran spanning musin MUC1, MUC4, dan MUC16 yang dibawa ke membran plasma. Musin MUC4 predominan dalam sel skuamosa stratifikasi konjungtiva. Berlawanan dengan sel skuamosa stratifikasi, sel goblet mensintesa dan mensekresi musin berbentuk gel, besar, berat molekul besar yaitu musin MUC5AC. MUC5AC disekresi masuk TF kemudian membentuk kerangka lapisan mukus yang menyebarkan glyocalyx dan dasar epitel. Hasil eksperimental menunjukkan bahwa lapisan ini berupa suatu gel. MUC5AC sebagai proteksi utama untuk permukaan mata pada penyakit inflamasi





kronis dimana tidak didapatkan sel goblet menunjukkan kerusakan konjungtiva dan kornea. Kedua tipe musin tersebut berperan penting melindungi epitel permukaan mata. Sekresi musin membersihkan permukaan mata dari debris, dan membran musin membentuk glyocalyx barrier terhadap patogen dan penetrasi pewarna.

Pada penyakit autoimun SS terjadi penurunan ekspresi musin MUC5AC yang berasal dari sel goblet dan bermakna, hal ini sesuai dengan pengamatan jumlah sel goblet konjungtiva sangat menurun, tetapi perubahan yang pasti apakah karena stimulasi inflamasi akut atau kronis masih tidak jelas (Berry, 2008; Corrales, 2011, Dartt, 2014).

#### 2.1.4.5.2. Lapisan Akuos

Lapisan akuos pada TF, atau bagian gel musin yang lebih banyak akuos, mengandung larutan oksigen, elektrolit, dan protein multipel termasuk *growth factor* (GF), yang membantu mempertahankan tropik dan proteksi lingkungan pada epitel permukaan mata. Normalnya jaringan epitel permukaan mata tergantung pada GF seperti EGF, HGF, dan KGF. Immunoglobulin dan protein lain seperti lactoferrin, lysozym, defensin, IgA memproteksi permukaan mata dari infeksi bakteri dan virus.

Protein lain, IL-1 reseptor antagonis membantu meminimalisir inflamasi permukaan mata. Elektrolit TF seperti Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> dan lainnya, dalam serum konsentrasinya sama, osmolaritas air mata normal sekitar 300 mOsm/L, yang membantu mempertahankan volume sel epitel normal. Osmolaritas yang tepat juga diperlukan untuk mempertahankan potensial membran saraf kornea normal dan homeostasis seluler dan fungsi sekresi. Sebagian besar kegiatan normal aliran air mata dari kelenjar lakrimal accessory (*Wolfring* dan *Krause*) terletak di fornix konjungtiva superior dan palpebra superior. Kelenjar lakrimal utama berfungsi





sebagai reservoir mensuplai OS untuk mengeluarkan infeksi atau partikel iritasi yang mengancam integritas epitel (Tsubota, 2003; Hodges, 2005; Lemp, 2005).

Sebagian besar sekresi air mata digerakkan melalui unit fungsional lakrimal, dengan stimulasi saraf sensori aferen permukaan mata. Sinyal berintegrasi dalam CNS dan dirubah atau dimodifikasi oleh fungsi kortikal seperti emosi. Di bawah anestesia topikal produksi air mata berkurang sekitar 66%, atau dengan anestesia umum ketika semua emosi dan stimulus sensori aferen dihilangkan, maka produksi air mata semakin berkurang (Tsubota, 2003; Hodges, 2005; Lemp, 2005).

#### 2.1.4.5.3. Lapisan lipid

Lapisan lipid disekresi kelenjar meibom yang mempunyai duktus keluar anterior ke mucocutaneous junction palpebra, meminimalkan evaporasi air mata dan memfasilitasi penyebaran TF di atas permukaan kornea. Selain itu mencegah kulit-asam lemak permukaan mata masuk dan terputusnya TF pada margin palpebra (Pflugfelder, 2004; Foulks, 2007).

#### 2.1.4.6. Efek *Aging*

Menurut Pflugfelder (2004) *aging* dapat mempengaruhi unit fungsional lakrimal melalui beberapa jalur. Pertama dengan berkurangnya aliran informasi aferen akibat akson sensori yang hilang, sehingga menyebabkan respon terhadap stimulus lingkungan sekitarnya hilang. Selain itu efek CNS karena *aging* telah jelas pada komponen sinap atau adanya neurotransmitter, yang dapat mempengaruhi proses input dari unit fungsional lakrimal. Inervasi kornea menunjukkan efek *aging* yang bermakna pada sekitar dekade keempat dan terjadi penurunan *threshold* sensori. Hal ini terjadi karena akson *dropout*, degenerasi kolateral, atau langsung hilangnya sel ganglion, sehingga memberi implikasi lebih luas. Hilangnya cabang





akson menyebabkan efek sekunder menurunnya densitas terminal, baik pada sistim autonom atau sensorik. Pada mekanisme *aging* mempengaruhi sistim parasimpatis untuk mengurangi fungsi sekresi, meningkatkan aktivasi imun, dan berpotensi pada disfungsi homeostatik permukaan mata. Reflek kedip, akibat langsung stimulasi kornea, menunjukkan *oscillation* pada usia di atas 40 tahun dan meningkat pada usia lebih 60 tahun. Hal ini akibat hilangnya neuron dopaminergik substansia nigra. Bagaimanapun, osilasi reflek kedip berhubungan dengan SDE terkait dengan usia, dan mempunyai respon terhadap iritasi kornea. Degenerasi yang berhubungan dengan usia, sebagian besar menyebabkan disfungsi lakrimal. Perubahan patologi kelenjar lakrimal tersebut akan terjadi fibrosis difus lobuler dan atrofi, selain itu aliran dan volume air mata juga berkurang (Draper, 1999; Pflugfelder, 2004).

#### 2.1.4.7. **Symptomatic Ocular Surface Disease (SOSD)**

Permukaan mata adalah mukosa khusus yang terdapat pada tiga regio berbeda yaitu konjungtiva, limbal korneoskleral dan kornea. Komponen ini sangat vital dan saling berhubungan dengan struktur adneksa dan fungsi kelopak mata, serta sistem lakrimal. Pada permukaan mata secara biologis berupa suatu rangkaian kesatuan kompleks, mempunyai respon terhadap pemeliharaan kejernihan kornea, stabilitas TF untuk kejernihan penglihatan, sebagai proteksi mata terhadap mikrobial dan mekanis. Limbal merupakan sel progenitor yang mempunyai respon terhadap homeostasis, sebagai sumber utama regenerasi sel epitel kornea dan sel epitel konjungtiva yang penting pada permukaan mata, selain itu sebagai suatu *barrier* antara epitel kornea dan epitel konjungtiva. SDE merupakan salah satu komponen SOSD. Pada klasifikasi lesi konjungtiva dan kornea terdapat tipe epitelisasi skuamosa dan tipe defisiensi sel punca limbal. Defisiensi sel punca limbal





menghasilkan suatu kelainan permukaan mata yang menimbulkan permasalahan yaitu epitelisasi kornea yang terganggu, defek epitel persisten, vaskularisasi kornea, sikatrik kornea, dan konjungtivalisasi kornea (Ang, 2004; Cauchi, 2008).

#### 2.1.4.8. Konjungtiva dan *Tear Film* (TF)

Konjungtiva adalah membran mukous translusen tipis pada mata, berhubungan dengan kornea dan limbus, membentuk epitel permukaan mata yang merupakan bagian untuk mempertahankan sistem visual permukaan mata, serta menghubungkan antara bolamata dan kelopak mata. Epitel superfisial dilapisi oleh TF. Secara histologi, merupakan unsur utama permukaan mata, terdiri dari epitel sekretori stratifikasi non keratinisasi dengan dasar substansia propria atau stroma. Stroma konjungtiva bulbi berikatan longgar dengan jaringan dibawahnya. Pada limbus, konjungtiva bulbi (pada zona ini, juga disebut dengan konjungtiva limbal) melekat kuat ke kapsula Tenon dibawahnya, membentuk cincin dengan lebar 3mm. Ketebalan epitel konjungtiva bervariasi, dari 6-9 lapisan pada konjungtiva bulbi sampai 2-3 lapisan pada zona fornix dan tarsal. Pada limbus mengalami transisi gradual, dari epitel konjungtiva ireguler ke epitel kornea reguler. Epitel limbal mempunyai proyeksi *fingerlike* masuk kedalam lamina propria, dengan nama palisade Vogts yang mengandung sel punca kornea. Epitel limbal terdiri sampai 15 lapis dalam palisade dan 3 lapisan pada bagian apikal palisade. Disini, sel epitel superfisial datar, dan menjadi lebih kuboid ke arah zona konjungtiva. Epitel pada zona ini tidak ada sel goblet, tetapi pada lapisan basal sel langerhan melanosit berlebihan dengan jumlah yang sesuai derajat pigmentasinya (Pflugfelder, 2004; Ilene, 2005; Harun, 2013).





Pada konjungtiva manusia terdapat 3 zona utama dengan lapisan yang berbeda. Sel basal berupa selapis sel kuboid yang melekat ke membran basemen dengan hemidesmosom dan kompleks aderen. Sitoplasma sel epitel konjungtiva mengandung filamen intermediate sitokeratin. Sel basal mampu bermitosis, sebagai karakteristik sel undiferensiasi. Lapisan intermediate lebih kolumnar dan terdapat pada area epitel yang lebih tebal, khususnya fornix dan limbus. Kelompok sel mengandung filamen intermediate pada *fascicle* yang lebih tipis daripada sel basal.

Sel pada lapisan intermediate menjadi progresif lebih poligonal dan makin datar setelah mencapai permukaan konjungtiva, dimana pada keadaan normal masih nonkeratinisasi. Sel superfisial, mempunyai morfologi bervariasi tergantung lokasinya. Pada area tarsal dan bulbi berbentuk sel kuboid, di area fornix lebih poligonal, sedangkan di limbus lebih datar. Hal ini dikarenakan suatu adaptasi terhadap peningkatan tekanan mekanis. Lapisan superfisial epitel mudah diangkat dari lapisan epitel yang lebih dalam dengan teknik sitologi impresi, dan dapat menggambarkan sel epitel dan kuantitas sel goblet. Teknik ini juga dapat mengidentifikasi perubahan patologi serta perkembangan penyakit permukaan mata dan dapat menetapkan keratinisasi lapisan epitel superfisial. Non keratinisasi permukaan mata merupakan hal penting pada mata normal. Metaplasia skuamosa adalah perubahan karakteristik yang ditemui pada SDE (Ang, 2004; Harun, 2013).

Meskipun lokasi pasti sel punca epitel konjungtiva belum dipastikan, beberapa studi mengemukakan bahwa fornix dan beberapa area konjungtiva bulbi dan limbal mengandung sel punca. Fornix adalah tempat yang paling logis karena sel punca pada fornix dilindungi dari lingkungannya. Permukaan apikal dari sel superfisial menunjukkan mikropilika dan mikrovilli yang sama dengan kornea dan





mudah dilihat melalui transmisi *scanning electron micrograph*, yang berfungsi memperbesar penyerapan pada permukaan epitel konjungtiva dan menstabilkan *anchor* TF di membran sel epitel dan *glycocalyx* (Girolamo, 2011; Harun, 2013).

Sel epitel berikatan dengan sel *neighbors* melalui *tight junction*, *gap junction* dan desmosome yang berhubungan dengan filamen *intermediate* intrasitoplasmik atau cytokeratin. Epitel melekat ke basal membran dan stromal dibawahnya yang terdiri dari 1) hemidesmosome; 2) filamen sitokeratin intrasitoplasmik berhubungan dengan hemidesmosome; 3) *anchor* filamen berikatan dengan hemidesmosome, setelah melintasi membran *basemen*, ke *anchorage fibers*; 4) *anchorage fibers* dari kolagen tipe VII masuk ke dalam *inner face* dari membran basal; 5) *plaque anchor*, terdiri dari tipe kolagen IV, VI dan insersi *anchor* serabut (Nagasaki, 2005; Ganji 2005).

Sel epitel khususnya mengandung fascicle bersilangan berupa tonofilamen *intermediate* yang disebut cytokeratin dan berkumpul ke arah desmosom dan hemidesmosom. Perinuklear dan area di bawah sel membran, terletak organel intraseluler (mitokondria, sistim golgi, dan retikulum endoplasmik), secara esensial tidak didapatkan tonofilamen. Pada sel permukaan epitel dengan area berbeda terdapat struktur sitoskeleton yang bervariasi. Pada konjungtiva fornix tidak didapatkan desmosom, sedangkan di konjungtiva tarsal dan bulbi, dan di area limbal lebih luas serta ditemukan desmosom lebih banyak, serta saling berhubungan dengan filamen *intermediate*. Sitokeratin adalah protein yang terekspresi sebagai dimers dengan berat molekul berbeda-beda yang dapat terdeteksi dengan antibodi spesifik. Secara imunologi deteksi sitokeratin digunakan untuk menunjukkan epitel





yang berasal dari sel kultur, untuk mengidentifikasi perbedaan epitel dari permukaan mata (misalnya: konjungtiva versus korneal) (Ganji, 2005; Ebrahimi, 2009).

### 2.1.5. Efek Patologi **Syndrome Dry Eye (SDE)** pada permukaan mata/ Ocular Surface

Faktor penting dalam mempertahankan barrier epitel kornea adalah membran sel dengan musin yang melapisi epitel kornea superfisial, dan *tight junction complex* menghubungkan sel yang berdekatan. Pada SDE keadaan barrier ini mengalami gangguan sehingga mengakibatkan kematian, hilangnya, atau disfungsi sel epitel kornea apikal yang terdiferensiasi baik. Pada SDE hilangnya sel yang terpapar karena diferensiasi jelek, sel subapikal menyebabkan *tight junction* dan *glycocalyx* matur berkurang. Telah dilaporkan bahwa terputusnya *tight junction* pada epitel kornea apikal terjadi karena respon terhadap aktivasi stres yang berhubungan dengan faktor transkripsi seperti NF- $\kappa$ B dan AP-1. Peningkatan DNA *binding* faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan AP-1 ini telah diamati pada surfaktan dengan konsentrasi rendah menyebabkan iritasi okuler ringan (Yeh, 2003; Pflugfelder, 2004; Lan, 2012).

Dari penelitian *in vitro* dan *in vivo* sel epitel kornea bahwa terpaparnya lingkungan hiperosmolaritas, mengaktivasi stres intrinsik yang berhubungan dengan *signaling pathway*, sehingga dapat menstimulasi produksi molekul proinflamasi. Hal ini juga terdeteksi sama pada permukaan mata penderita SDE. Hasil paparan kultur epitel kornea manusia dengan peningkatan konsentrasi sodium chloride, osmolaritas meningkat dari 300 ke 500 mOsm yang menghasilkan aktivasi (fosforilasi) stress-associated protein kinase seperti p38, c-jun n-terminal kinase (JNK), dan ERK 1 dan

2. Selanjutnya mengaktivasi regulator transkripsi (seperti AP1) sehingga





meningkatkan produksi sitokin inflamasi (misal, IL-1 dan TNF- $\alpha$ ) dan MMPs. Efek proinflamasi pada stres hiperosmolar dapat dihambat dengan pengobatan pada sel yang secara farmakologi merupakan inhibitor kinase. Mediator inflamasi yang lepas dari sel epitel permukaan mata yang teraktivasi akibat respon stres hiperosmolar maka akan mengawali kaskade inflamatori permukaan mata, menyebabkan disfungsi kelenjar/sel yang mensekresi air mata serta gangguan permukaan mata (Pflugfelder, 2004; Gamache, 2004; Lan, 2012).

Sitokin yang lepas dari sel epitel teraktivasi dapat sebagai pemicu produksi molekul adesi oleh endotel vaskuler dan sel epitel konjungtiva pada parakrin. Ekspresi molekul adesi bersama dengan epitel memproduksi kemokin, menyebabkan diapedesis dan retensi sel inflamasi konjungtiva. Sitokin yang diproduksi oleh epitel permukaan mata teraktivasi pada SDE juga akan menyebabkan proliferasi epitel, diferensiasi, atau apoptosis, baik secara langsung ataupun tidak langsung (Yeh, 2003; Pflugfelder, 2004; Luo, 2004).

#### **2.1.6. Pengaruh Seks dan Hormon Seks Steroid (HSS) pada *Syndrom Dry Eye* (SDE)**

Terdapat hipotesa bahwa jenis kelamin berhubungan dengan adanya perbedaan prevalensi SDE diduga akibat defisiensi androgen dan pengaruh estrogen secara endogen ataupun eksogen. Pada HSS (androgen, estrogen, progesteron) mempunyai efek berbeda dalam sistem imun wanita dan pria. Androgen, estrogen, dan progesterin mempengaruhi imunitas *innate* dan adaptif. Telah diketahui HSS mengatur maturasi, proliferasi, migrasi, membantu fungsi sel punca pluripoten, sel B, sel B autoreaktif, sel T helper, sel T supresor, sel NK,





monosit dan makrofag. Pada HSS juga mengontrol sintesis, sekresi, dan/atau aksi antibodies, sitokin, *growth factor*, molekul adesi, proto-oncogen, faktor thymus, dan agen immunosupresif. Selain itu HSS meregulasi densitas limfosit dan reseptor faktor imun, ekspresi autoantigen, generasi autoantibodis, dan formasi kompleks imun, serta berpengaruh terhadap respon imun, *clearance*, antigen dan organisme infeksi.

Peran HSS memodifikasi keparahan inflamasi, rejeksi allograft, graft-versus-host disease. Estrogen terlibat pada patogenesis dan/atau progresifitas beberapa kelainan autoimun, sedang androgen telah menunjukkan bahwa sering dapat menurunkan sekuele pada penyakit autoimun. Terapi androgen telah digunakan untuk menurunkan ekspresi autoimun pada hewan coba SLE, thyroiditis, poliartritis. Keadaan yang sama terjadi pada SS. Estrogen berperan pada etiologi SS. Estrogen meningkatkan aktivasi poliklonal B-aktivasi sel, membentuk auto antibodi, kelainan jaringan. Sebaliknya androgen pada SS, memberi proteksi dan mensupresi berbagai kelainan imunopatologi (Sullivan, 2002; Sullivan, 2004; Smith, 2004; Sullivan, 2017).

Level androgen dan estrogen relatif merupakan hal penting untuk menetapkan progresifitas SS. Pada metabolisme seks steroid perubahan selanjutnya disebabkan oleh sitokin proinflamasi, seperti IL-1, TNF- $\alpha$ , dan atau IL-6, dimana pada jaringan eksokrin SS konsentrasi meningkat. Perubahan proinflamasi ini termasuk adanya peningkatan aktivitas aromatase (misalnya: konversi androstenedione ke estrone, testosterone ke  $17\beta$ -estradiol) dan stimulasi reduktif  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase *pathway* (estrone yang lebih aktif  $17\beta$ -estradiol), yang menyebabkan reduksi tambahan pada rasio testosterone/estrogen. Sitokin proinflamasi menurunkan ekspresi reseptor androgen mRNA, mengganggu efek androgen, meningkatkan corticosteroido-genesis. Mekanisme terakhir, yaitu terdapat





potensiasi aromatisasi dari adrenal atau testicular androgen, yang menyebabkan testoteron berkurang dan level estrogen meningkat. Efek yang sangat penting selama stres (pada SS meningkat), yaitu ketika sirkulasi konsentrasi IL-1 meningkat, menghasilkan peningkatan kortisol dan konsentrasi serum testoteron berkurang (Pfeilschifter, 2002; Pflugfelder, 2004; Sullivan, 2004).

Peran estrogen pada etiologi inflamasi kelenjar lakrimal dan SDE defisiensi akuos pada SS tidak jelas. Pada tikus model SS, estrogen menunjukkan akselerasi, sedang anti estrogen seperti selektif modulator reseptor estrogen telah menunjukkan supresi, proses penyakit sistemik. Pemberian  $17\beta$ -estradiol dengan kuantitas fisiologis pada mice betina MRL/lpr intak selama 3 minggu setelah onset penyakit menyebabkan area infiltrat limfoid meningkat signifikan pada jaringan lakrimal dan penurunan volume air mata secara bermakna. Peneliti lain melaporkan bahwa terapi estrogen pada *mice diabetic non obese male castrated* tidak mempunyai efek terhadap akumulasi limfosit pada kelenjar lakrimal. Kelompok peneliti lainnya menguraikan bahwa ovariectomi prepubertal mice NFS/sld sebelum onset penyakit, inflamasi kelenjar lakrimal meningkat, dan dapat disupresi dengan terapi estrogen selama 4 minggu dengan dosis farmakologi ( $\sim 30x$  fisiologis). Pada model tikus lain, dan penderita SS yang mempunyai thimus, bahwa interaksi endokrin-imun penting untuk perkembangan dan/atau progresifitas kelainan jaringan lakrimal, dan efek estrogen pada sistim imun adalah tergantung-dosis, yang berarti studi estrogen farmakologi pada mice NFS/sld tidak terbukti. Peneliti lain mengidentifikasi gen yang dikontrol oleh estrogen pada kelenjar lakrimal, menyebabkan kelenjar lakrimal regresi, hiposekresi sehingga terjadi SDE. Sebaliknya, identifikasi gen dalam regulasi estrogen mendukung bahwa estrogen meningkatkan fungsi kelenjar





lakrimal, menekan inflamasi jaringan lakrimal pada SS, dan sebagai terapi SDE.

Hasil riset studi lain, menunjukkan bahwa pada kelenjar lakrimal dengan autoimun atau normal pada TF, estrogen tidak berpengaruh (Pflugfelder, 2004; Lemp, 2005; Straub, 2007).

Reseptor dari berbagai HSS (androgen, estrogen, progesteron) telah diidentifikasi pada jaringan mata tikus, kelinci dan manusia. Kedua tipe Reseptor Estrogen (RE) nukleus, RE $\alpha$  dan RE $\beta$ , terdapat pada konjungtiva dan kornea tikus

jantan maupun betina. Dalam struktur mata tersebut juga ditemukan mRNA 5 $\alpha$ -reductase, merupakan enzim kunci yang terlibat dalam metabolisme androgen yang menjadi derivat aktif secara biologis (5 $\alpha$ -dihydrotestosterone). Konjungtiva merupakan target organ HSS, dimana epitel konjungtiva sensitif terhadap estrogen.

Dengan ditemukannya RE pada konjungtiva tikus, kelinci, dan manusia dapat diduga bahwa HSS memiliki peranan penting dalam patogenesis SDE. Jaringan lain yang memiliki reseptor HSS adalah kelenjar lakrimalis dan kelenjar meibom. Kelenjar meibom merupakan target organ untuk androgen, dimana androgen mengatur profil lipid dalam jaringan ini (Tachibana, 2000; Fuchsjager-Mayri, 2002; Oliveira, 2004).

Efek estrogen diperantarai oleh reseptor nukleus spesifik, yaitu RE $\alpha$  dan RE $\beta$ , yang akan bertindak sebagai faktor transkripsi bila terjadi ikatan dengan ligandnya. Ikatan RE-ligand akan menimbulkan reaksi spesifik pada jaringan

berbeda. Jenis kelamin dan usia merupakan faktor yang mempengaruhi ekspresi RE. Penurunan jumlah estrogen dalam sirkulasi wanita pasca menopause menyebabkan penurunan jumlah transkripsi mRNA RE pada jaringan target.

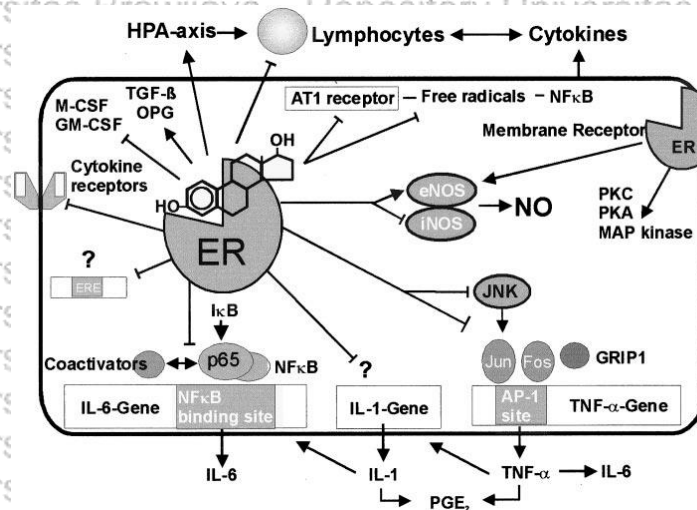
Perubahan fisiologis RE berperan dalam patogenesis SDE (Tachibana, 2000; Gupta, 2005; Suzuki, 2006).





Pada wanita yang mengalami menopause, baik secara alami maupun operatif, terjadi peningkatan ekspresi dan sekresi sitokin proinflamasi, yaitu IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ , dimana peningkatannya serupa dengan yang terjadi pada reaksi host terhadap infeksi atau kerusakan jaringan. Defisiensi estrogen juga dapat meningkatkan respon sel terhadap beberapa sitokin melalui peningkatan jumlah reseptor sitokin, sehingga pemberian estrogen diharapkan dapat menurunkan aktivitas sitokin. Terapi estrogen dapat menghambat ekspresi dan/atau sekresi IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  pada sel osteoblast, monosit/makrofag, dan kultur darah. Beberapa literatur menguraikan bahwa estrogen endogen terutama estron merupakan bentuk dominan pada fase pasca menopause membantu dalam efek penghambatan ekspresi sitokin. Hubungan antara estrogen dan sitokin tersebut tidak sederhana. Data yang diperoleh dari berbagai penelitian tampaknya kontradiktif dengan teori, dimana banyak juga penelitian berskala besar yang gagal menunjukkan pengaruh estrogen terhadap ekspresi sitokin, dan terdapat pula penelitian yang menunjukkan efek bifasik atau stimulasi estrogen terhadap sekresi IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  pada sel monosit/makrofag dan fibroblast. Efek potensial estrogen terhadap aktivitas sitokin proinflamasi dapat dilihat pada skema berikut (Pfeilschifter, 2002; Suzuki, 2006; Versura, 2007).





**Gambar 2.4. Skema pengaruh potensial estrogen terhadap aktivitas sitokin proinflamasi.** RE yang teraktivasi menghambat ekspresi gen IL-6 dan TNF- $\alpha$  secara langsung melalui jalur NF $\kappa$ B dan AP-1 dependent, dan menghambat gen IL-1 melalui mekanisme yang belum diketahui. Sitokin yang secara langsung/tidak langsung dipengaruhi estrogen adalah IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, OPG, dan TGF- $\beta$ . Efek stimulasi:  $\downarrow$ , efek penghambatan:  $\perp$ . (Pfeilschifter, 2002).

#### 2.1.6.1. Struktur dan Fungsi Reseptor Estrogen (RE)

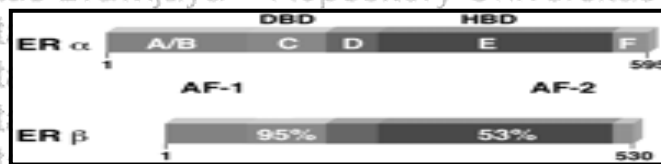
Hormon estrogen bekerja melalui kemampuannya bergabung dengan reseptor intrasel kemudian terikat pada regio spesifik kromatin, DNA atau keduanya untuk menimbulkan perubahan pada laju transkripsi gen spesifik. Hormon dalam cairan ekstrasel terdapat dengan konsentrasi yang sangat rendah, umumnya berkisar dari  $10^{-15}$  hingga  $10^{-9}$  mol/L. Rendahnya kadar ini sel target bukan hanya harus membedakan antara berbagai hormon yang berbeda tetapi juga antara suatu hormon tertentu. Derajat perbedaan ini dihasilkan oleh molekul pengenal yang terikat pada sel dan disebut reseptor. Hormon memulai efek biologisnya melalui pengikatan dengan reseptor spesifik dan setiap sistem pengontrolan yang efektif harus memiliki sarana untuk menghentikan suatu respon. Kerja yang ditimbulkan





oleh hormon umumnya akan berhenti ketika efektor tersebut terlepas dari reseptor (Berek, 2002; Straub, 2007).

Reseptor Estrogen merupakan anggota hormon nuklear, famili dari reseptor intra seluler yang diaktivasi oleh hormon  $17\beta$  estradiol. Fungsi utama RE adalah sebagai faktor transkripsi DNA *binding* yang meregulasi ekspresi gen. Selain itu mempunyai fungsi tambahan yaitu dapat bebas bertranskripsi pada DNA *binding*. RE terdiri dari 2 bentuk yaitu RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$ . RE- $\alpha$  dengan kode gen pada kromosom 6. RE- $\beta$  dikode oleh gen kromosom 14,q22-q24. Di bawah ini adalah gambar struktur dari RE (Berek, 2002; Fuchsjager- Mayri, 2002).



**Gambar 2.5. Struktur asam amino RE.** Terbagi menjadi 6 regio dalam 5 domain dengan label A sampai F. (Berek, 2002).

Regio A/B atau yang disebut juga *regulatory domain* merupakan bagian yang paling memiliki variasi dalam superfamily reseptor. Perbedaan utama antara RE  $\alpha$  dan  $\beta$  terletak pada bagian ini, dimana RE  $\beta$  tidak memiliki bagian fosforilasi dan *transcription activation function* (TAF-1). TAF-1 ini berfungsi sebagai pemicu proses transkripsi saat tidak didapatkan hormon (Berek, 2002).

Karakteristik hormon-*binding* RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$  sama, hal ini menunjukkan bahwa keduanya respon pada hormon yang sama. Kedua reseptor berikatan pada elemen respon estrogen dengan afinitas sama, dan afinitas estradiol pada tiap-tiap





reseptor sama. Perbedaannya, sebagai contoh pada fitoestrogen mempunyai afinitas yang lebih besar pada RE- $\beta$  dari pada RE- $\alpha$ . Hal ini karena ligan serta afinitas RE  $\alpha$  dan  $\beta$  isoform berbeda; sedang pada 17 $\beta$  estradiol berikatan pada reseptor  $\alpha$  dan  $\beta$ ; pada estrone dan raloxifen lebih menyukai reseptor  $\alpha$ ; estriol dan genistein pada reseptor  $\beta$ . Dengan kata lain, agen estrogen menunjukkan lebih selektif dalam berikatan pada satu reseptor. Pesan genetik yang berbeda bukan hanya karena terdapat perbedaan pada ikatan afinitasnya, tetapi juga adanya variasi dalam mekanismenya, dan khususnya terdapat perbedaan dalam bentuk konformasi dan selulernya. Selain itu, karena *regulatory domain* pada kedua RE berbeda, dan kemampuan RE- $\beta$  dalam mengaktivasi transkripsi gen yaitu *Transcription Activation Function-1* (TAF-1) gagal. Pada RE $\alpha$  terdapat beberapa tempat fosforilasi dan TAF-1. TAF-1 dapat menstimulasi transkripsi dalam *hormone binding*. Pada kedua RE, *regulatory domain* berbeda, sehingga pada RE- $\beta$ , TAF-1 mungkin tidak ada. RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$  memiliki karakteristik yang hampir sama pada kemampuan pengikatan hormon. RE- $\alpha$  memiliki waktu paruh 4-7 jam, sehingga disebut sebagai reseptor yang memiliki waktu pergantian yang cepat (Berek, 2002; Matthews, 2003).

#### 2.1.6.2. Mekanisme kerja Hormon Seks Steroid (HSS)

Pada struktur okuler, HSS bekerja melalui jalur klasik genomic dan jalur cepat non genomic. Kedua jalur tersebut mengatur satu sama lain dengan saling bergantian. Respon genomic klasik HSS berlangsung lambat dan menghilang dalam beberapa jam sampai hari. Efek hormon melalui elemen respon hormon. HSS berdifusi melalui membran plasma dengan pasif kedalam sitoplasma dan pada sel target melalui pembentukan kompleks dengan protein reseptor spesifik intra seluler kemudian mengaktivasi molekul reseptor. Aktivasi reseptor bekerja sebagai protein

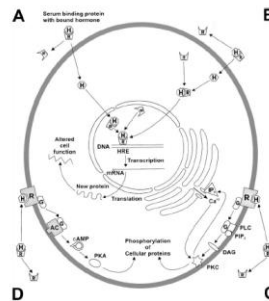




regulasi transkripsi yang berkaitan dengan nuklear DNA yang memiliki *sequence* spesifik. Elemen respon hormon mengatur transkripsi yang berhubungan dengan gen yang memberikan respon dan pada beberapa kasus tahap paska transkripsi berubah sehingga menghasilkan suatu perubahan yang terus menerus dari mRNA spesifik protein (Berek, 2002; Gupta, 2005).

Pada target organ non konvensional mekanisme kerjanya adalah melalui jalur non genomic yang sangat cepat dengan waktu singkat. Mekanisme non genomic tidak mengaktifasi transkripsi atau translasi. Estrogen dan progesteron dalam berbagai struktur telah diketahui dapat menyebabkan aksi yang dapat bekerja dengan cepat. Mekanisme ini akan membuat perubahan aliran ion yang terus menerus, membuka atau menutup kanal ion, atau merubah aktivitas enzim yang terlibat dalam proses transportasi. Efek non genomic dari steroid tetap terjadi walaupun steroid dihambat masuk dalam sel. Hal ini menunjukkan bahwa masuknya steroid dalam sel di atas tidak penting untuk efek *non genomic*. Steroid ini dapat berinteraksi dengan membran protein untuk menginduksi sinyal ke dalam sel. Mekanisme di atas spesifik untuk struktur tertentu yang merupakan target dari steroid. gambar dibawah menunjukkan tentang jalur genomic dan non genomic HSS (Gupta, 2005).





**Gambar 2.6 Diagram skematik HSS melalui mekanisme genomic dan non genomic dalam sel.** Hormon seks berikatan dengan nukleus (A) atau sitoplasma (B) atau reseptor membran (C dan D) dan berperan pada satu atau beberapa rangkaian kejadian A, B: mekanisme genomic: transduksi direk sinyal pada DNA melalui HR kompleks. C, D: mekanisme non genomic: generasi cAMP dan atau jalur sinyal Calcium. (Gupta, 2005).

Gupta *et.al.*, (2005) telah menunjukkan bahwa jalur sinyal transduksi fosfoinositide oleh  $17\beta$  estradiol spesifik di dalam sel target estrogen melalui membran reseptor spesifik. Selain itu juga menunjukkan aktivasi fosfolipase sehingga menyebabkan pemecahan lemak fosfoinositide yang akhirnya menyebabkan masuknya kalsium. Enzim lain yang terlibat dalam transduksi sinyal dan atau diferensiasi terminal diregulasi oleh *influx* kalsium. Interaksi reseptor steroid kompleks dengan respon gen mengakibatkan ikatan reseptor yang dapat menyebabkan induksi atau represi pada transkripsi, tergantung pada target gen dan struktur (Gupta, 2005).

Beberapa hasil studi menunjukkan estradiol berperan pada proliferasi sel. Disebutkan bahwa injeksi intraperitoneal estradiol pada traktus reproduksi tikus imatur dari sel non proliferasi menjadi sel proliferasi. Pada epitel vagina dengan *marker gen k24* estradiol mengaktivasi proliferasi. Tampaknya efek proliferasi estradiol melalui mekanisme genomic. (Gupta, 2005).





## 2.1.7. Genistein

### 2.1.7.1. Struktur dan Morfologi Genistein

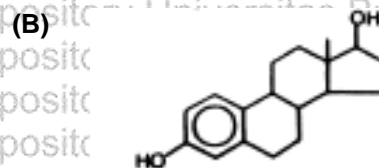
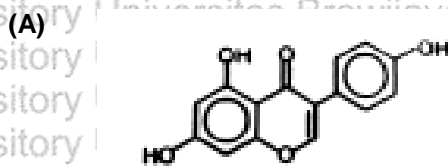
Fitoestrogen terdiri dari 3 kelompok, yaitu isoflavon, lignans, dan coumestan.

Golongan fitoestrogen yang paling banyak dijumpai dan paling banyak digunakan adalah kelompok isoflavon. Fitoestrogen merupakan substansi biologis aktif yang terdapat dalam tumbuhan dengan struktur kimia yang serupa dengan  $17\beta$ -estradiol.

Kemiripan struktur ini terkait dengan kemampuannya untuk mengikat RE pada berbagai sel dan efek estrogenik atau antiestrogenik yang dimilikinya. Isoflavon merupakan kumpulan *nonsteroidal weakly-estrogenic* yang mempunyai aktivitas mirip estrogen. Struktur molekul isoflavon dan estradiol adalah superimpose pada dua grup *hydroxyl* (C-3 dan C-17 pada estradiol atau C-7 dan C-4 pada isoflavon) pada lokasi yang sangat mirip dengan struktur tiga dimensi (Cooke, 2006; Yang, 2013; Garg, 2016).

Genistein (4',5,7 trihidroksiisoflavon) merupakan salah satu komponen aktif yang paling banyak terdapat dalam isoflavon. Komponen aktif lain yang terkandung dalam isoflavon adalah daidzein dan equol. Sumber alami isoflavon adalah dari kedelai. Isoflavon terdapat dalam 2 bentuk, yaitu bentuk inaktif dan aktif. Bentuk inaktif adalah *glycoside* (genistin dan daidzin), sedangkan bentuk aktifnya adalah *aglycone* (genistein dan daidzein). Rumus kimia genistein adalah  $C_{15}H_{10}O_5$ . Struktur kimia genistein dan  $17\beta$  estradiol dapat dilihat pada gambar berikut ini ((Cooke 2006). Rice, 2006; Takeshi, 2006).





**Gambar 2.7. Struktur kimia.** Gambar (A) adalah genistein dan (B) adalah 17- $\beta$  estradiol (Cooke 2006).

Struktur kimia genistein serupa dengan 17 $\beta$ -estradiol (E2). Genistein juga memiliki cincin fenol, yang merupakan prasyarat untuk berikatan dengan RE.

Genistein dapat terikat pada RE $\alpha$  dan RE $\beta$ , namun afinitasnya 50-100 kali lebih lemah dibanding 17 $\beta$ -estradiol. Afinitas ikatan genistein lebih besar pada RE $\beta$  (87%) dibanding RE $\alpha$ (4%), sedangkan E2 memiliki afinitas yang sama besar untuk kedua reseptor (Cooke 2006; Rice, 2006; Takeshi, 2006).

Sebagian besar genistein yang berasal dari diet terdapat dalam bentuk inaktif, yaitu terkonjugasi dengan molekul glukosa. Konjugasi dengan molekul glukosa tersebut akan meningkatkan kelarutan dalam air, karena genistein merupakan komponen hidrofobik dengan berat molekul rendah. Untuk menjadi aktif maka bentuk inaktif tersebut harus dipecah oleh mikroflora usus (Cooke, 2006; Rice, 2006).

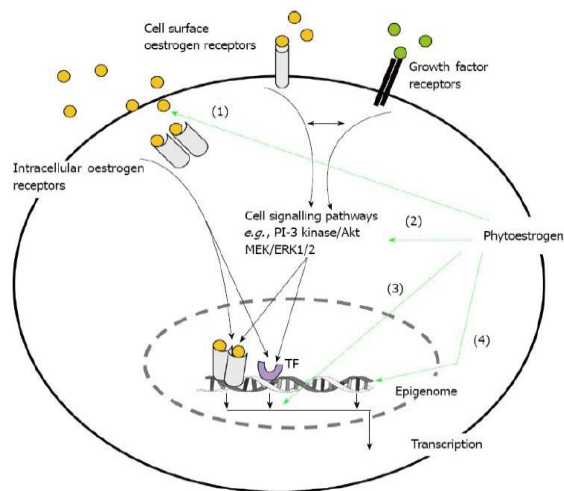
#### 2.1.7.2. Mekanisme kerja fitoestrogen

Sebagai fitoestrogen, genistein mempunyai berbagai aksi antara lain aksi pada RE, *cell signaling pathway*, regulasi siklus sel, apoptosis, perubahan epigenetik DNA, protein histon dan RNA untuk mengubah transkripsi/translasi protein. Pada level yang lebih tinggi misalnya pada level seluler, menyebabkan apoptosis dan diferensiasi pada sel kanker, menghambat sel proliferasi, modulasi siklus sel, efek antioksidan, menghambat angiogenesis dan supresi osteoclast dan limfositik.





Fitoestrogen dapat berikatan secara lemah pada RE di permukaan sel, selain itu juga dapat berinteraksi dengan reseptor *growth factor* atau kinase yang bersifat *ligand-dependent* terhadap RE dan pada *non-estrogen dependent gene*. Mekanisme fitoestrogen dapat melalui RE pada permukaan sel atau berinteraksi dengan GF dan sitokin sinyal *pathway*. Fitoestrogen dapat memodulasi respon GF atau mengaktivasi/inhIBisi kinase yang merubah ligan-independen terhadap aktivitas transkripsi RE atau faktor transkripsi lain seperti AP-1 dan NF-kB. (Krzysztof, 2000; Nagaraju, 2013; Bilal, 2014).



**Gambar 2.8. Berbagai jalur aksi fitoestrogen dalam merubah transkripsi gen.** (1) Sebagai agonis/antagonis estrogen dalam aktivitas transkripsi pada reseptor estrogen; (2) Modulasi *cell signaling pathway* yang bisa teraktivasi baik oleh reseptor estrogen maupun reseptor *growth factor* lain dan mengaktivasi transcription factor (TF); (3) Inhibisi/stimulasi transkripsi gen yang meregulasi apoptosis dan siklus sel; dan (4) Perubahan epigenetik DNA, protein histon dan RNA untuk mengubah transkripsi/translasi protein. (Bilal, 2014)

Beberapa pustaka menguraikan bahwa mekanisme senyawa phenol, memodulasi sinyal *pathway* intraseluler, dengan menghambat aktivasi transkripsi NF-kB, MAPK, dan/ atau mengurangi pada level mRNA dan/atau level protein,





mediator inflamasi seperti IL-1 $\beta$ , IL-6,8; COX2, setelah pemberian phenol hasilnya pada beberapa ada yang kontradiksi. Dari literatur disebutkan bahwa respon anti inflamasi flavonoid tidak ada mekanisme definitif atau *single* yang menerangkan bahwa semua efek phenol mempunyai sinyal spesifik dan tergantung dari tipe sel, sehingga hubungan aktivitas/ struktur tidak berlaku secara umum. Hasil studi Sergent (2010) melaporkan bahwa pada keadaan menyerupai inflamasi epitel intestinal *human* model *in vitro* dengan substansi IL-1 $\beta$ , kemudian ditambahkan genistein 50 $\mu$ M, dapat menghambat produksi IL-1 $\beta$  (Yoon, 2005; Aggarwal, 2006; Sergent, 2010; Bellik, 2013).

Fitoestrogen khususnya genistein banyak digunakan sebagai alternatif TSH.

Efek seluler fitoestrogen ini dipengaruhi banyak faktor antara lain konsentrasi bahan/dosis, status reseptornya, keberadaan estrogen endogen dan target organ yang dituju. Golongan isoflavon memiliki aktivitas estrogenik selektif, yaitu memberikan respon estrogenik pada jaringan tertentu dan bersifat menghambat efek estrogen pada jaringan lainnya. Pada konsentrasi fisiologis, genistein bekerja melalui pengaturan jalur estrogenik. Interaksi bersifat langsung melalui kompetisi dengan estrogen yang terikat pada RE. Paparan yang lama menyebabkan penurunan ekspresi RE dan menurunkan respon terhadap estrogen endogen, sehingga dikatakan genistein memiliki sifat anti estrogenik. Efek anti estrogen yang dimiliki isoflavon disebabkan karena isoflavon secara kompetitif berikatan pada RE, efek penghambatan terhadap sintesis estrogen, atau meningkatnya sintesis *estrogen-binding protein*. Dosis fitoestrogen dengan konsentrasi *over saturating dose* ( $\geq 10$   $\mu$ mol/L) menyebabkan apoptosis atau menghambat pertumbuhan sel (Moreira, 2014; Garg, 2016).





Keuntungan sistemik fitoestrogen dibanding estrogen adalah menurunkan kolesterol LDL tanpa menginduksi hipertrigliseridemia, mengurangi gejala menopause tanpa meningkatkan resiko neoplasia uterus atau payudara, meningkatkan fungsi pembuluh darah tanpa mempercepat angiogenesis patologis, dan tidak didapatkan laporan kejadian trombotik. Genistein merupakan agen inovatif yang menjanjikan sebagai terapi penyakit dan memberi efek yang menguntungkan pada penyakit kardiovaskular, menopause. Genistein juga sebagai agen immunosupresif. Semua efek pada ketiga aksi mekanisme level biologis memerlukan konsentrasi genistein yang bervariasi dan terjadi setelah pemberian genistein *purified* dengan dosis tinggi. Genistein merupakan obat potensial dengan multi mekanisme pada sel *live* dan toksisitasnya rendah.

(Taylor, 2009; Bilal, 2014; Garg, 2016).

### 2.1.7.3. Sifat Fisika dan Kimia Isoflavon

Isoflavon mempunyai berat molekul rendah dan bersifat hidrofobik. Pada keadaan terkonjugasi menjadi glukosa, glukoronida atau sulfat, kelarutan dalam air meningkat. Kelarutan dalam air dapat berubah dengan asetilasi atau malonisasi konjugat glukosa dan metilasi uap isoflavon. Polaritas isoflavon tergantung jumlah gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut yang bersifat polar. Semakin banyak jumlah gugus hidroksil, maka semakin banyak pula ikatan hidrogen yang dapat terbentuk sehingga senyawa tersebut akan mudah larut dalam pelarut yang polar (Takeshi, 2006; Yang, 2012).

Genistein memiliki sifat lipofilik, berat molekulnya 270 Da, dengan tingkat kelarutan dalam air yang rendah, yaitu 5,3  $\mu\text{M}$  namun memiliki tingkat kelarutan yang tinggi dalam metanol yaitu 32,5  $\mu\text{M}$  pada suhu 25<sup>o</sup>C. Genistein juga memiliki





sifat termodinamik dan kimiawi yang stabil, dimana kemampuan aktivitas antioksidannya dapat bertahan selama 20 hari pada suhu 70°C (Yang, 2012).

#### 2.1.7.4. Bioavailabilitas topikal Flavonoid pada mata

Pemberian obat secara topikal pada mata merupakan aplikasi yang tepat pada penyakit mata dan merupakan jalur utama masuknya obat pada segmen anterior bola mata. Beberapa faktor yang mempengaruhi bioavailabilitas obat topikal adalah formulasi (stabilitas dan solubilitas pada akuos) dan permeabilitasnya (drainase prekorneal, struktur kornea dan drainase pembuluh darah konjungtiva ataupun duktus nasolakrimalis). Secara umum flavonoid terikat pada residu gula yang mempengaruhi mekanisme absorpsi. Flavonoid glikosida lebih hidrofilik daripada bentuk aglykon. Aglykon adalah molekul lipofilik dengan octanol/ koefisien *water partition* antara 0 dan 4. Molekul lipofilik dapat berinteraksi dengan (lipo) protein pada membran dan bisa menembus lipid bilayer dengan difusi pasif. Sementara itu sifat molekul dari obat sendiri memainkan peran penting dalam meningkatkan bioavailabilitas obat topikal pada mata, dimana masuknya obat pada mata adalah dengan cara difusi pasif, sehingga untuk mencapai penetrasi obat yang efisien pada okuler, komponen obat sebaiknya tidak terlalu lipofilik ataupun hidrofilik. Bentuk glikosid (bentuk *conjugated*) dari isoflavon mempunyai bioavailabilitas lebih baik daripada bentuk aglikon (bentuk *unconjugated*) yang lebih bersifat lipofilik, sehingga bentuk aglikon perlu dihidrolisa terlebih dahulu untuk mengubah kelarutannya dalam air (Takeshi, 2006; Majumdar, 2010; Yang, 2014).

#### 2.1.7.5 Mekanisme farmakologi anti-inflamasi flavonoid

Aktifitas farmakologi bioflavonoid dapat digunakan sebagai prevensi atau terapi penyakit okuler. Telah dilaporkan bahwa flavonoid menghambat beberapa





mediator, yang teraktivasi dalam keadaan inflamatori tertentu seperti *nitric oxide* (NO), prostanooid dan leukotrien, sitokin, molekul adesi. NO diproduksi dari L-arginine dengan tiga *nitric oxide synthase* (NOS) *enzymes*; *endothelial NOS* (eNOS), *neuronal NOS* (nNOS) dan *inducible NOS* (iNOS). iNOS mempunyai respon terhadap produksi NO dengan jumlah paling besar dengan durasi yang lebih lama.

Prostanooid and leukotrien juga terlibat dalam inflamasi. Prostaglandin dan thromboxan A2 diproduksi oleh *cyclooxygenas* (COX-1, COX-2 and COX-3). Pada umumnya COX-1 terekspresi pada berbagai jaringan (beraksi dengan adanya respon terhadap hormon dan stimulus lainnya) dimana COX-2 terekspresi paling tinggi dalam sel inflamasi. Leukotrien merupakan generasi *lipooxygenas* (LOX), 5- dan 12-LOXs yang berhubungan dengan proses inflamasi. Selain itu, berbagai sitokin yang terlibat dalam inflamasi dan proinflamasi yaitu (interleukin; IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) atau anti inflamasi (IL-10, TGF- $\beta$ ). Adesi molekul juga berperan penting dalam inflamasi; pembuluh darah sel endotel dengan karakteristik mempunyai respon terhadap stimulus proinflamasi dan terdapat leukosit dengan ekspresi adesi molekul selektif pada permukaan, seperti *vascular cell adhesion molecules* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecules* (ICAM-1) dan *endothelial cell selectin* (E-selectin). Flavonoid pada proses inflamasi mempunyai mekanisme dengan berbagai jalur multipel. (Tunon,2009; Majumdar, 2010; Scuderi, 2012).

#### 2.1.8. *Delivery* obat pada okuler

*Delivery* obat ke situs target dapat melalui topikal, periokular, intravitreal, rute sistemik atau pemberian secara oral tergantung pada sifat fisikokimia molekulnya.

Aplikasi secara topikal cara yang paling disukai pada mata dan melibatkan





penerapan formulasi *solution*, *suspension* atau *ointment* ke dalam cul-de-sac mata.

Alur secara topikal merupakan cara utama yang digunakan untuk *delivery*/pelepasan

obat ke segmen anterior mata. Namun, beberapa faktor misalnya formulasi

(kelarutan dan stabilitas *aquos*) dan permeabilitas / pelepasan (drainase prekorneal,

ultrastruktur kornea dan drainase melalui vaskulatur konjungtiva atau duktus

nasolacrimal) pada alur ini bioavailabilitas terbatas. Secara periokular lebih efektif

dan mempunyai invasif yang minimal, alur pemberian obat untuk segmen posterior

mata, dapat secara *subconjunctival*, *subtenon*, *retrobulbar*, *peribulbar*, *posterior rute*

*juxtasclear*. Barrier secara fisik yang berhubungan dengan alur ini adalah sklera,

koroid-Bruch membran, dan epitel pigmen retina (RPE). Pemberian oral atau

sistemik adalah pilihan lain dalam pelepasan agen terapi pada jaringan okuler

bagaimanapun rute ini lebih menantang karena terdapat beberapa barrier secara

fisiologis (melalui pembuluh darah memberikan agen terapi untuk jaringan mata.

Namun, alur ini mempunyai beberapa hambatan fisiologis (*blood-ocular-barrier*

(BOB), *blood-retinal-barrier* (BRB), dan melibatkan paparan obat secara sistemik

yang tidak diperlukan. Pemberian secara intravitreal, pelepasan obat secara

langsung ke humor vitreous adalah sangat efektif tetapi invasif (Takeshi, 2006;

Majumdar, 2010).

Bahan molekul obat secara fisikokimia mempunyai peran yang sangat

penting dalam menentukan bioavailabilitas okular pada pemberian secara topikal.

Secara umum terdapat hubungan parabolik antara partisi/koeffisien dan

bioavailabilitas kornea antara lemak/air. permeabilitas maksimal diamati pada

senyawa dengan log partisi oktanol-air (logP) pada kisaran 2 -3, untuk tes steroid

secara seri. Jadi, untuk perembesan jaringan okular efisien, senyawa harus tidak





terlalu lipofilik atau terlalu hidrofilik. Dengan adanya perbedaan flavonoid, aglikon lebih lipofilik dibandingkan dengan konjugat yang berhubungan dengannya. Log-P ditemukan mempunyai variasi besar pada *subclass flavonoid* dan sebagian besar berkisar antara  $X$  ke  $X_1$  aspek pemberian obat merupakan hal yang dipertimbangkan, pelarutan adalah parameter tambahan. Kelarutan flavonoid tergantung pada sebagian besar dalam bentuk yang tersedia; senyawa dengan satu atau lebih gugus gula adalah lebih polar sedangkan aglycones mempunyai polaritas paling kecil, dengan flavonoid yang sangat dialkilasi menjadi larut lipid. Dengan kelarutan dan log-P menjadi larut lipid. Disamping solubilitas dan log-P secara konfigurasi tiga dimensi, struktur isomerik, jumlah cincin substituen, interaksi dengan masuknya membran dan penghabisan transporter, berat molekul dan ikatan hidrogen dan berat molekul donor / akseptor pada suatu molekul adalah penentu paling penting pada difusi jaringan okular dari flavonoid (Majumdar, 2010; Agarwal, 2014).

#### 2.1.9. NF- $\kappa$ B *pathway* pada permukaan mata

*Nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) merupakan faktor transkripsi terlibat dalam proses regulasi berbagai fungsi sel, termasuk dalam proses imun, respon inflamasi, proliferasi, apoptosis dan pertahanan sel. Selain itu berperan penting pada transisi epitel-mesenchym dan kanker sel punca. Kelompok NF- $\kappa$ B mempunyai 5 protein: RelA (p65), RelB, Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50), dan NF- $\kappa$ B2 (p52), setiap protein membentuk homo atau heterodimer. NF- $\kappa$ B yang teraktivasi adalah heterodimer, terdiri dari p65 dan p50 atau mengandung p52 dan RelB. Pada sel manusia, tanpa sinyal ekstraseluler spesifik NF- $\kappa$ B terdapat dalam sitoplasma melalui hubungan yang kuat dengan inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , beraksi sebagai NF- $\kappa$ B inhibitor, dan protein p100, yang

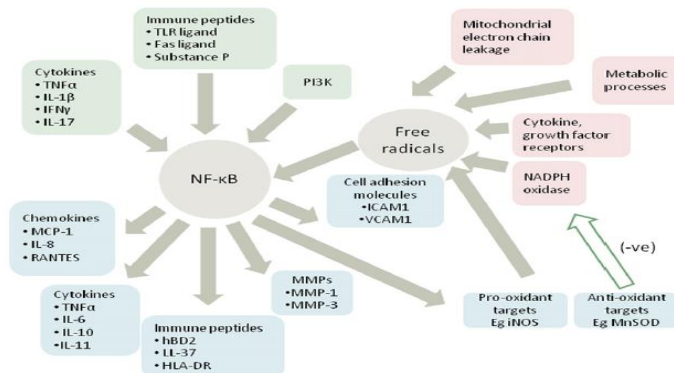




keduanya sebagai inhibitor dan precursor NF- $\kappa$ B DNA-*binding* sub unit. NF- $\kappa$ B dapat diaktivasi oleh beberapa tipe stimulus seperti sitokin, oksidan, virus, imun, faktor pertumbuhan, agen infeksi, stress oksidatif, obat-obatan, radiasi sinar gama dan sebagainya. Aktivasi NF- $\kappa$ B terjadi melalui fosforilasi I $\kappa$ B $\alpha$  dengan IKK $\beta$  dan/atau fosforilasi p100 oleh IKK $\alpha$ , menyebabkan gradasi I $\kappa$ B $\alpha$  dan/atau proses p100 kedalam bentuk lebih kecil (p52). Proses ini menjadi dua bentuk NF- $\kappa$ B yang teraktivasi (p50-p65 dan p52-RelB) menjadi bebas, translokasi ke nukleus untuk berikatan ke NF- $\kappa$ B-spesifik DNA-*binding site* kemudian meregulasi transkripsi target gen. Selain itu IKK $\alpha$  juga meregulasi aktivasi NF- $\kappa$ B-ekspresi gen secara langsung melalui fosforilasi histone H3 ( Kalaitzidis, 2005;; Lan, 2012; Wolfe, 2012).

Sampai saat ini telah banyak penelitian NF- $\kappa$ B pada permukaan mata , seperti pada DES, pterygium, alergi, infeksi mikroba dan lain lain. NF- $\kappa$ B merupakan anatomi unik, dibutuhkan pada proses fisiologi kornea dan *microenvironment* imunologi khusus pada permukaan mata, sehingga pada proses inflamasi permukaan mata mempunyai skuele dan hasil yang berbeda dengan bagian lain di tubuh . NF- $\kappa$ B berperan penting dalam perkembangan kornea dan konjungtiva. I $\kappa$ B kinase (IKK)  $\alpha$ , *upstream* I $\kappa$ B, penting untuk diferensiasi epitel kornea dan konjungtiva. Yang paling utama , jalur regulasi NF- $\kappa$ B pada imunologi dan inflamasi serta proses *downstream* dapat berpotensi dan dieksploitasi sebagai terapi pada penyakit permukaan mata manusia (Sarkar, 2008 (Lan, 2012).





**Gambar 2.9. NF- $\kappa$ B pathway pada permukaan mata.** Molekul *upstream* dan *downstream* dari sel epitel kornea dan kornea *derived* fibroblast. Proses akumulasi radikal bebas atau ROS pada sisi kanan. Target NF- $\kappa$ B mempunyai efek anti oksidan atau pro oksidan. (Lan, 2012)

Hubungan NF- $\kappa$ B dengan tipe sel lainnya terdapat tiga katagori yaitu melalui regulasi imunitas *innate* pada permukaan mata seperti pada infeksi mikroba; regulasi angiogenesis dan respon *wound healing* permukaan mata seperti pada proses *wound healing* abrasi mekanis dan kimia *induced* keratitis; dan regulasi respon inflamasi karena *stress*. Pada tulisan ini difokuskan pada regulasi respon inflamasi karena *stress* (Sarkar, 2008; Prasad, 2010; Lan, 2012).

#### 2.1.9.1. Jalur NF- $\kappa$ B melalui regulasi respon inflamasi karena *stress*

Jalur NF- $\kappa$ B melalui regulasi respon inflamasi karena *stress* ini sangat penting terhadap proses produksi sitokin inflamasi. Hasil studi menunjukkan bahwa I $\kappa$ B $\xi$  adalah regulator NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\xi$  (-/-) mice terdapat pada inflamasi permukaan mata kronis dan sel goblet hilang. Selain itu terdapat infiltrasi sel CD45R/B220+ dan CD4+ pada matrik subkonjungtiva. (Sarkar, 2008; Prasad, 2010; Lan, 2012).

##### 2.1.9.1.1. Tipe *stress* dengan sinyal *trigger* NF- $\kappa$ B

Dengan sinyal *trigger* NF- $\kappa$ B terdapat dua tipe *stress* yaitu *stress* hiperosmolar dan *stress* radiasi UV. Sesuai dengan penelitian ini, yang dibahas





adalah *stress* hiperosmolar yang mengaktifasi jalur NF- $\kappa$ B di kornea dan sel epitel limbal. *stress* hiperosmolar telah dipercaya sebagai faktor utama pada patogenesis DES pada manusia. Pada DES glandula yang terlibat dalam sekresi airmata adalah glandula lacrimal, glandula meibom, serta sel epitel konjungtiva dan goblet yang mensekresi mukus. Pada glandula lakrimal dengan model murine diabetik, ekspresi NF- $\kappa$ B dan advanced glycation end product (AGE) didapatkan lebih besar daripada kontrol. Ikatan AGE ke reseptor AGE merupakan pemicu aktivasi NF- $\kappa$ B. Pada tikus umur tua, aktivitas NF- $\kappa$ B dan AGE juga meningkatkan resistensi insulin, sehingga keterlibatan NF- $\kappa$ B pada metabolik dan disfungsi TF berhubungan dengan usia. (Sarkar, 2008; Prasad, 2010; Lan, 2012).

#### 2.1.9.1.2 Tipe *stress* dengan stimulasi oleh sitokin spesifik

Tanpa memperhatikan faktor pencetus awal, keparahan inflamasi permukaan mata disebabkan karena efek sitokin spesifik disekresi kedalam airmata pada sel epitel permukaan mata. IL-1 dan IL-17 juga terlibat dalam regulasi kompleks inflamasi permukaan mata. IL-1 $\beta$  diaktivasi NF- $\kappa$ B pada fibroblas kornea, yang dihambat oleh deksamethasone dan triptolide. (Sarkar, 2008; Prasad, 2010; Lan, 2012).

Secara molekuler terdapat *cross-talk* antara kelompok faktor transkripsi, dimana faktor transkripsi RE juga diketahui sebagai mediasi inhibisi aktivitas NF- $\kappa$ B pada beberapa level. *Cross-talk* antara keduanya tersebut merupakan regulator penting pada sistim endokrin dan imun untuk terapi penyakit inflamasi, kanker, imun. Dari hasil penelitian, dengan berbagai konsentrasi genistein dari 25  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, dan 50  $\mu$ M paling sedikit 24 jam menunjukkan inhibisi NF- $\kappa$ B dan penurunan pertumbuhan sel pada *cell line in vitro* terutama pada *multiple pancreatic cancer lines* ( Kalaitzidis, 2005; Sarkar, 2008; Wolfe, 2012).





Aktivasi NF-kB diperlukan untuk induksi serta mempertahankan *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT). Analisa profil ekspresi gen menunjukkan bahwa gen yang terlibat pada EMT dan deregulasi sinyal NF-kB merupakan karakteristik molekuler yang menonjol pada karsinoma sel skuamosa, sehingga sinyal NF-kB berperan penting pada EMT. Inhibisi NF-kB dapat menghentikan progresivitas, invasi, metastase kanker akibat deregulasi dalam proses EMT (Sarkar, 2008).

#### 2.1.10. Interleukin-1 (IL-1) $\beta$

Interleukin-1 (IL-1) berfungsi sebagai mediator penting untuk proses inflamasi, imunitas, dan penyembuhan luka; merupakan *inducer* poten untuk sitokin lainnya; menstimulir produksi MMP oleh epitel konjungtiva dan sel-sel inflamasi.

Terdapat dalam 2 jenis yaitu: IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Keduanya tersebut terdapat dalam air mata normal. Prekursor IL-1 $\beta$  merupakan bentuk dominan yang didapatkan dalam air mata normal. Peningkatan aktivitas enzim protease (ICE/caspase-1, MMP-9) akan menginduksi konversi prekursor IL-1 $\beta$  menjadi IL-1 $\beta$  matur. Konsentrasi IL-1 $\alpha$  air mata lebih tinggi pada penderita SDE dibanding orang normal. Konsentrasi prekursor IL-1 $\beta$  air mata lebih tinggi pada orang normal, sedangkan bentuk maturnya lebih banyak didapatkan pada penderita SDE dibanding orang normal.

Rasio prekursor IL-1 $\beta$  dibanding IL-1 $\beta$  matur pada orang normal adalah 1, sedangkan pada penderita SDE, baik tipe evaporatif maupun defisiensi akuos, adalah 0,4; sehingga dapat dikatakan bahwa IL-1 $\beta$  memiliki peranan penting dalam patogenesis SDE. Evaluasi ekspresi IL-1 $\beta$  dapat dilakukan dengan teknik sitologi impresi dan pemeriksaan imunohistokimia. Pada sitologi impresi tidak terdeteksi IL-





$1\alpha$ , namun didapatkan bahwa IL- $1\beta$  matur lebih banyak pada penderita SDE dibanding orang normal. Dengan pewarnaan imunohistokimia tampak sel dengan ekspresi IL- $1\beta$  inti berwarna coklat (positif) pada sitoplasma (Luo, 2004).

### 2.1.11 Sel Punca Limbal / Limbal Stem Cell (LSC)

Sejak 20 tahun yang lalu, disimpulkan bahwa sel punca epitel kornea berlokasi dilimbal. Sel tersebut mempunyai dua nama yaitu sel punca epitel kornea dengan berdasar fungsinya, dan sel punca limbal (LSC) dengan dasar pada lokasinya ( Di Girolamo, 2011).

Limbal secara anatomi merupakan transisi dari sklera dan epitel konjungtiva yang masuk kedalam kornea serta telah diketahui sebagai lokasi sel punca epitel kornea. Pada limbal, epitel kolumner berlapis pada konjungtiva berubah menjadi epitel skuamus berlapis di kornea, dan substansi vaskuler lapisan propria pada bagian bawah epitel konjungtiva kaya akan vaskuler yang berasal dari pleksus limbal. Pleksus vaskuler merupakan hal penting dalam memberikan nutrisi dan oksigen untuk aktivitas mitosis sel punca limbal. Limbal juga berfungsi untuk membatasi sel epitel konjungtiva dari epitel kornea (Ebrahimi, 2009; Girolamo, 2011).

Beberapa hasil studi melaporkan bahwa terdapat pergerakan sentripetal sel epitel kornea dari limbal ke kornea sentral, sehingga jelas bahwa sel prekursor proliferasi terdapat pada limbal. Konsep limbal merupakan dasar sel punca hal ini karena didukung adanya pengamatan di laboratorium hewan bahwa tidak mungkin adanya defek epitel kornea permanen tanpa kerusakan limbal. Disebutkan bahwa adanya kerusakan limbal sirkumferensial atau sebagian, menghasilkan pertumbuhan





epitel konjungtiva yang bervariasi. Selanjutnya terdapat perubahan karakteristik yaitu timbulnya vaskularisasi, inflamasi kronis, integritas epitel terganggu dengan manifestasi sebagai permukaan mata ireguler, erosi rekuren, atau defek epitel persisten, destruksi membran basement, dan pertumbuhan jaringan fibrous. Perubahan ini disebut dengan defisiensi sel punca limbal dan gambaran klinis ini digunakan untuk mengidentifikasi suatu insufisiensi sel punca (Lavker, 2003; Ebrahimi, 2009).

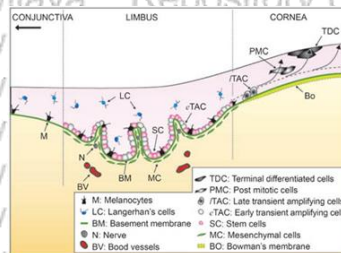
Telah diketahui bahwa limbal merupakan suatu populasi sel mitosis. Pada sel mitosis ini tidak ada pertanda diferensiasi epitel kornea hal ini konsisten dengan pengertian klasik dari sel punca pluripotensial *undifferentiated*, berproliferasi menghasilkan *daughter cell* yang menunjukkan suatu diferensiasi progresif. Pada tikus terdapat pertanda monoklonal 4G10.3 yang terwarnai pada mitosis sel limbal basal. Pada model kornea tikus dengan luka trauma termis atau mekanis, secara dramatis sel positif 4G10.3 jumlahnya meningkat selama fase penyembuhan luka.

Adanya keberhasilan dengan transplantasi jaringan limbal dalam membuat atau merubah epitel kornea manusia menjadi normal, atau dengan transplantasi sel dari limbal yang dikembangkan secara invitro, jelas bahwa terdapat sel punca pada epitel kornea. Proses diferensiasi merupakan fungsi sel punca epitel kornea yang terletak pada limbal basal. Sel punca dapat berdiferensiasi pada dua jalur. Pada jalur pertama diferensiasi sel punca berfungsi untuk repopulasi epitel kornea. Proses ini dimulai dengan pergerakan sel punca secara horisontal sentripetal menuju ke kornea yang disebut diferensiasi kedalam *Transient Amplifying Cells* (TAC). TAC merupakan lapisan basal kornea dan proliferasi serta diferensiasi menuju *Post Mitotic Cells* (PMC) dari epitel kornea suprabasal. PMC secara histologis





diidentifikasi sebagai *wing cell*. Diferensiasi PMC menghasilkan *Terminally Differentiated Cells* (TDC) pada epitel kornea superficial. Jalur kedua diferensiasi sel punca hasil dari migrasi vertikal sel punca seperti diferensiasi, dimana spesifisitas proses ini masih sedikit diketahui, tetapi telah dipercaya dan ditetapkan bahwa juga penting sebagai barier untuk memisahkan konjungtiva dan kornea (Ebrahimi,2009; Secker, 2009; Ang, 2011).



**Gambar 2.10. Skema hipotesa sel punca limbal.** Sel punca epitel limbal terletak pada lapisan basal limbal. Pada level epitel ini, di area sekitarnya terdapat beberapa tipe sel lain seperti *immediate progeny* misalnya eTAC, M, LC. Telah ditetapkan bahwa tipe sel tersebut sebagai sel niche. Diketahui bahwa eTAC berfungsi sebagai produksi progeni dengan diferensiasi menjadi *late TACs* (ITAC) yang terletak pada lapisan basal kornea, selanjutnya ke supra basal *post-mitotic cells* (PMC), dan akhirnya menuju superficial *terminally differentiated cells* (TDC). *Basement membrane* (BM) limbal terpisah dengan epitel dari dasar stroma dan mempunyai beberapa komponen unik. Stroma limbal mengandung *mesenchymal cells* (MC), dan selain itu juga sebagai sediaan yang disebut *niche cells*. Karena stroma limbal mempunyai invasi dan vaskularisasi banyak, peran masing-masing saraf (N) dan pembuluh darah (BV) pada *niche* saat ini masih terus berkembang luas. (Ebrahimi,2009)

### 2.1.11.1. Karakteristik Sel Punca Limbal

#### 2.1.11.1.1. Ukuran Sel Dan Morfologi

Sel punca pada berbagai jaringan dewasa mempunyai fenotipe *undifferentiated*, dengan karakteristik ukuran sel kecil dan rasio (N/C) nukleus terhadap sitoplasma besar. Ukuran nukleus dan kandungan DNA konstan tetapi volume sitoplasma yang berubah seperti pada proses diferensiasi dalam mengawali menjadi protein baru. Volume sitoplasma terdapat dan terdeteksi peningkatan 4 kali





lipat, hal ini sama seperti sel dari lapisan basal ke lapisan granular dalam epidermis (Arpitha, 2008; Takacs, 2009; Girolamo, 2011).

Hasil studi secara mikroskopis confocal in vivo menunjukkan sel basal limbal mempunyai diameter lebih kecil (sekitar  $10\mu\text{m}$ ), rasio N/C lebih besar, dan mempunyai densitas sel lebih besar daripada kornea sentral atau lapisan sel suprabasal limbal. Dari transmisi mikroskop elektron menunjukkan sel kecil bulat pada dasar palisade *rete ridge* dengan nukleus besar mengandung heterochromatin banyak. DNA dan nukleolus terdeteksi sedikit sekali, jarang terdapat sitoplasma (Takacs, 2009; Girolamo, 2011).

#### 2.1.11.1.2. *Slow cycling* dan *Self-renewal*

Pada keadaan normal, sel punca diam tidak bergerak. Jarang sekali mengalami divisi sel, dan menghasilkan sel turunannya (*daughter cells*), melipat gandakan TACS untuk meningkatkan jumlah yang besar dari sel diferensiasi, sehingga terjadi homeostasis jaringan normal. Aktivitas mitosis sel punca yang rendah ini dapat melindungi integritasnya dengan cara mengurangi kemungkinan kerusakan DNA. Selama mitosis, sel punca mengalami pembaruan sendiri, misalnya; paling sedikit ada satu *daughter cell* dipelihara dan dipertahankan sebagai sel punca (*stemness*). Bagaimanapun, sel punca dapat menunjukkan suatu kapasitas proliferasi yang mengesankan pada trauma jaringan atau kultur. Siklus lambat (*slow-cycling*) dari sel punca limbal dapat dideteksi dengan label *retaining cell*. Akhir-akhir ini beberapa molekul dari sel punca epitel limbal telah dikemukakan berperan dalam *self-renewal* (Deng, 2009; Castro, 2013).





### 2.1.11.2. Sel punca epitel konjungtiva

Epitel konjungtiva adalah suatu jaringan yang bisa memperbanyak diri sendiri (*self-renewal*). Pergantian sel yang cepat, sel punca telah diketahui terdapat pada jaringan konjungtiva tersebut. Sel epitel diferensiasi terdapat pada manusia selamanya. Lokasi sel punca epitel konjungtiva masih kontroversi, bagian dari jaringan konjungtiva yang merupakan area konsentrasi sel punca bervariasi yaitu pada limbal (tikus), konjungtiva bulbi (manusia), fornix (kelinci, tikus dan manusia), konjungtiva palpebra (tikus), *mucocutaneous junction* (tikus dan kelinci). Hasil pengamatan klinis menunjukkan sel punca konjungtiva terdapat di fornix dan atau konjungtiva bulbi (Nagasaki, 2005; Ang, 2011).

Sel epitel kornea dan konjungtiva memiliki dua sel turunan yang berbeda dan telah dipercaya bahwa sel epitel kornea dan konjungtiva berasal dari populasi sel punca yang berbeda. Epitel konjungtiva terdiri dari sel keratinosit dan sel goblet. Li *et al* (2007) menunjukkan bahwa populasi sel epitel konjungtiva baik non-sel goblet maupun sel goblet berasal dari sel progenitor bipoten. Meskipun konjungtiva fornix merupakan tempat yang mengandung sel punca dengan proporsi lebih besar, sel punca konjungtiva juga terdapat pada seluruh epitel konjungtiva. Hal ini dijelaskan oleh peneliti lain dari hasil observasinya secara invitro menganalisa bahwa kapasitas proliferasi dari regio konjungtiva yang berbeda ternyata hasilnya sel punca terdistribusi di seluruh konjungtiva fornix dan bulbi. Beberapa hasil studi menguraikan bahwa *mucocutaneous junction* pada margin palpebra juga memberikan kontribusi terhadap regenerasi sel epitel konjungtiva (Ilene, 2005; Nagasaki, 2005; Li, 2007)).





Bagian stroma fornix terdiri dari jaringan kolagen dan serabut elastis, yang melindungi sel epitel dari robekan dan faktor mekanis. Konjungtiva fornix banyak mengandung vaskularisasi dan inervasi. Hal ini menunjukkan bahwa sel punca mempunyai respon cepat terhadap berbagai stimulus melalui sitokin atau mekanisme neural. Gambaran konjungtiva fornix ini penting dalam mempertahankan lingkungan homeostasis permukaan mata (Pflugfelder, 2004; Nagasaki, 2005; Deng, 2009).

### 2.1.11.3. Niche: *microenvironment* unik, mendukung *quiescent* sel punca limbal (LSC)

Pada LSC terletak dalam niche akibat suatu kombinasi secara biokimia dan anatomi pada masa perkembangan. Niche dipertahankan oleh kombinasi faktor intrinsik pada LSC sebagai sel punca spesifik-jaringan dewasa, dan faktor yang ada dalam lingkungannya. Faktor ekstrinsik merupakan molekul yang diproduksi oleh sel endotel vaskuler, sel otot polos disekitar pembuluh darah, dan/atau molekul yang lepas dari pembuluh darah. Selain itu faktor diluar sel konjungtiva yang berdekatan dengan TAC, bercampur dengan LSC yang berperan dalam mempertahankan populasi sel punca limbal (Sahai, 2012; Lander, 2012).

Stroma yang mendasari epitel limbal merupakan hal unik karena posisinya untuk menerima sinyal dari 6 populasi sel berbeda: 1) epitel kornea dan 2) epitel konjungtiva; 3) fibroblas stromal kornea dan 4) konjungtiva; 5) sel endotel vaskuler, dan 6) sel otot polos pembuluh darah episklera. Semua sel tersebut mensekresi diferensiasi *growth*, dan/atau faktor survival yang berakumulasi di stroma limbal serta membran basal epitel. Perbedaan faktor tersebut adalah produk sel residen; pengaruh protein yang lain dari serum yang lepas di vaskulatur limbal. Respon unik



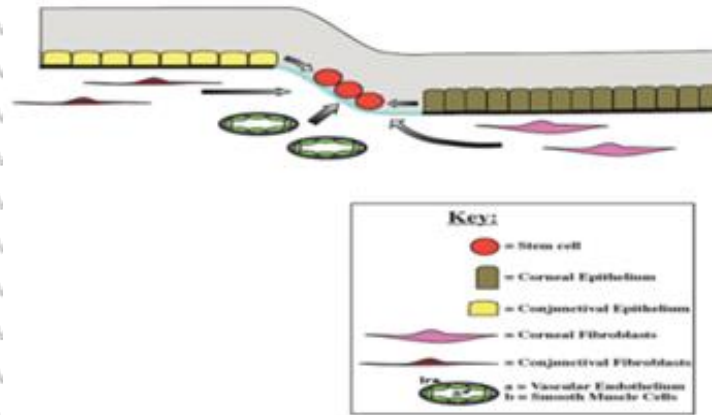


ini karena kombinasi sinyal yang saling tumpang tindih dan melengkapi, dan diduga bahwa sub populasi sel epitel kornea dalam mempertahankan fenotip *quiescent* dan berfungsi sebagai LSC didapatkan selama masa perkembangan mata di awal. Telah dipercaya bahwa faktor kombinasi yang sama menyebabkan LSC *quiescent* yang menetap dan mempertahankan sel punca limbal niche (Li, 2005; Li, 2007; Castro, 2013).

Ketika LSC berkurang dari niche, maka mempunyai respon sinyal *growth* dan diferensiasi pada jalur yang sama pada sel punca, dan bergerak sebagai eTAC, membagi secara cepat untuk beberapa populasi *doubling* dalam jumlah besar progeni. Hal ini terjadi ketika *human* sel punca limbal ditempatkan pada kultur. Pada keadaan yang sama, bila niche rusak oleh trauma berat terdapat perubahan pada faktor *growth/ diferensiasi/ survival* sesuai dengan perubahannya sendiri yang menyebabkan LSC diferensiasi ke eTACs, menghasilkan penurunan LSC di tempat trauma. Hal inilah yang menyebabkan bagaimana trauma limbal menghasilkan Limbal Stem Cell Defisiensi (LSCD) (Li, 2007; Castro, 2013).

Niche sel punca limbal mempunyai dua fungsi berbeda sebagai tempat *quiescent* dan proliferasi. Pada mata dewasa keadaan homeostatik, sinyal seimbang untuk mempertahankan sel punca non diferensiasi dan *survival* dari divisi sel serta sel *quiescent* LSC, divisi sel dipertimbangkan menjadi divisi sel asimetri karena memberi peningkatan ke satu sel eTAC dimana satu sel masih di LSC. Selama homeostasis, LSC proliferasi, tetapi jarang untuk menggantikan sel epitel kornea yang hilang dalam *tear film* (Stepp, 2005; Castro, 2013).





**Gambar 2.11. Niche sel punca epitel kornea/ limbal (LSC).** LSC dalam posisi unik untuk menerima sinyal seluler dari banyak sumber, Dengan petunjuk: anak panah. Sel epitel konjungtiva dan kornea-derived fibroblasts stromal, sama seperti pada endotel vaskuler dan asosiasi sel otot polos, semuanya berpotensi penting untuk generasi dan mempertahankan niche sel punca. Selain itu terdapat faktor sel jaringan *resident*, sitokin, dan molekul matrik yang juga berpengaruh pada niche melalui kebocoran dari pembuluh darah yang berdekatan. Faktor tersebut diduga membentuk gradien sitokin dalam niche untuk mempertahankan LCS dalam quiescent, fenotip undiferensiasi untuk kehidupan organisme. Membran basemen dibawah LCS komposisinya berbeda dari yang dibawah sel epitel konjungtiva dan kornea. Proteoglikan dan molekul matrik dalam membran basemen LCS dan dasar stroma berikatan dan sitokin keluar ke divisi sel secara langsung dan diferensiasi. Dengan mediasi perlekatan ke membran basemen dan transduksi sinyal integrasi bahkan dari lingkungan ekstraseluler, integrin berperan penting dalam mempertahankan sel punca pada keadaan undiferensiasi. (Stapp, 2005).

### 2.1.11.3.1. Identifikasi sel punca limbal (LSC) dan sel niche

Tahap awal studi niche limbal untuk identifikasi, dimana sebelum diketahui area lingkungan sekitar dengan akurat maka sel punca limbal tidak pasti. Metode yang umum untuk mengidentifikasi sel punca limbal adalah memberi label untuk mengetahui siklus sel secara lambat (*slow cycling*). Pada metode ini niche dari epidermis dan cardiac juga teridentifikasi. Tidak ada studi yang dilakukan dengan cara yang sama untuk mengidentifikasi komponen seluler niche limbal. Metode lain identifikasi sel punca epitel limbal berdasar ekspresi *marker*. Meskipun sel punca epitel limbal beberapa *marker* terekspressi baik, tetapi tidak ada konsensus *marker*





yang bisa dipercaya. Hal ini sangat masuk akal bahwa sel punca epitel limbal mengekspresikan kumpulan gen berupa “signatura” yang hasilnya lebih baik daripada tunggal. Hasil ini sama dengan yang ditemukan pada sel punca keratinosit epidermal. Pertanda *label-retaining* dan *immunostaining*, beberapa dugaan *marker* telah menyatakan bahwa tidak semua sel basal adalah sel punca, hal ini konsisten dengan dugaan bahwa sel punca tampak hanya suatu fraksi kecil dalam suatu jaringan. Dari heterogenitas sel basal limbal menduga bahwa sel punca limbal mempunyai kontak erat dengan progeni immediate, yaitu TACs. Dijelaskan apakah TACs di limbal berbeda lokasi pada lapisan basal kornea. Berdasar tahap diferensiasi yang masuk ke TACs awal vs *late* berturut-turut ditetapkan apakah TACs limbal, seperti pada niche cardiac, berperan dalam instruksi sel punca *fate* pada niche. Telah diketahui bahwa sel basal limbal juga mengekspresikan vimentin, merupakan *marker* sel mesenchym. Sel langerhan dan melanosit terdapat dalam lapisan basal limbal yang mengekspresi vimentin, maka studi mendatang diperlukan untuk menetapkan apakah sel punca epitel limbal juga mengekspresi vimentin yang sebenarnya menggambarkan sel niche. Klarifikasi dari pertanyaan tersebut dapat membantu mengidentifikasi sel niche limbal dan interaksinya dengan sel punca epitel limbal (Li, 2007; Lander, 2012; Nubile, 2013)

#### 2.1.11.3.2. Interaksi epitel-stromal dan *microenvironment* sel punca

Faktor intrinsik (sifat sel) dan ekstrinsik (faktor lingkungan disekitar sel) keduanya terlibat pada regulasi sel punca. Diduga bahwa sel punca ada dan hidup dalam suatu *microenvironment* yang membantu mempertahankan keadaan *undifferentiated*. Hasil kultur in-vitro sel epitel kornea dan limbal pada pertumbuhan dan proliferasi sel menunjukkan efek GF dan calcium ekstraseluler. Pada keadaan





kultur yang sama, proliferasi sel epitel limbal lebih cepat dan lebih resisten terhadap senyawa *tumor-promoting* daripada sel epitel kornea sentral. Sel basal limbal mengekspresikan level Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) lebih tinggi dibanding dengan sel diferensiasi dan matur, seperti sel basal kornea sentral. Konsentrasi reseptor EGF yang lebih besar, selama perkembangan dan ada luka maka akan membuat sel lebih cepat terstimulasi oleh GF dan mengalami divisi sel (Beuerman, 2004; Ganji, 2005).

Sel basal limbal juga mengekspresi filamen intermediate, sitokeratin 19, vimentin,  $\alpha_6\beta_4$  integrin, metallothionein, transferrin reseptor, dan ikatan protein dengan monoklonal antibodi AE1. Filamen intermediate terlibat dalam pemeliharaan arsitektur sel, dan berperan sebagai *anchorage* sel jaringan. Pada sel basal limbal terdapat protein lainnya dengan konsentrasi lebih tinggi daripada sel basal kornea sentral termasuk enzim metabolik, seperti Na-K-ATPase, sitokrom oksidase, dan karbonik anhidrase. Perbedaan konsentrasi protein menggambarkan karakteristik sel dalam perbedaan sifat fisiologi dan metaboliknya. Kelangsungan hidup jangka panjang dan perkembangbiakan serial dari sel epidermis memungkinkan di co-kultur dengan 3T3 fibroblas *feeder layer*. Sistem ini telah digunakan sukses untuk pengembangan sel epitel, termasuk sel epitel permukaan mata. Properti *growth* dari sel punca permukaan mata dan epidermis dipertahankan dalam sistem *feeder* 3T3. Telah ditetapkan identitas *growth-promoting factors* atau faktor antiapoptotik berasal dari interaksi epitel-mesenchym. Dari penelitian lain diuraikan bahwa inflamasi berperan penting pada sel punca mesenchim sebagai media perbaikan jaringan yang telah dipercaya mempunyai efek regenerasi melalui diferensiasi dan modulasi akibat respon inflamasi (Beuerman, 2004).





Membran basemen limbal berbeda dari kornea sentral. Membran basemen epitel kornea sentral mengandung protein yang diidentifikasi dengan monoklonal antibodi AE27 pada area limbal dengan jumlah sedikit. Sebaliknya, banyak kolagen tipe IV pada membran basemen limbal. Membran basemen kornea manusia dan epitel konjungtiva dapat dibagi tiga domain: membran basemen konjungtiva (tipe IV kolagen-positif, AE27-lemah), membran basemen limbal (tipe IV kolagen-positif, AE27-kuat), dan membran basemen kornea (tipe IV kolagen-negatif, AE27-kuat).

Membran basemen heterogen mempunyai peran dalam regulasi ekspresi keratin dan aspek lain diferensiasi epitel kornea. Pada keadaan tersebut *anchoring* fibril limbal meningkatkan adesi sel basal ke dasar stroma (Beuerman, 2004; Castro, 2013).

Interaksi epitel-stroma telah dipercaya bahwa sangat penting dalam mendukung fungsi kornea normal. Komunikasi interseluler antara sel epitel dan stroma kornea sangat penting selama perkembangan awal, homeostasis, dan penyembuhan luka yang dimediasi oleh berbagai sitokin. Berbagai GF, seperti TGF- $\beta$ , PDGF-B, IL-1 disintesa oleh sel epitel, sedang reseptor ditemukan pada fibroblas stromal. Karakteristik paling baik pada interaksi epitel ke stromal di kornea dimediasi oleh HGF diekspresi oleh fibroblas kornea dengan KGF, tereksresi sebagian besar pada fibroblas limbal. KGF berperan penting pada penyembuhan luka yang mengekspresikan KGF yang tinggi dan unik, penting dalam regulasi proliferasi, motilitas, atau diferensiasi selama divisi sel punca epitel dalam penyembuhan luka.

Diharapkan bahwa regulasi sel punca limbal dengan *microenvironment* mengalami perubahan epitel-stromal dari *growth factor* dan sitokin (Beuerman, 2004; Castro, 2013).





Identifikasi sel punca adalah penting untuk mengetahui pengertian mekanisme homeostatik normal yang meregulasi proliferasi dan mempertahankan jaringan pada tubuh. Karakteristik sel punca masih sedikit dimengerti karena *marker* molekuler yang dapat menyimpulkan perbedaan sel punca dari TAC belum teridentifikasi. Strategi dan *marker* yang digunakan untuk mengidentifikasi sel punca epitel dapat juga diaplikasikan terhadap sel punca limbal (Beuerman, 2004; Lander, 2012).

#### 2.1.11.4. *Marker* molekuler

Takacs (2009) menguraikan bahwa saat ini *marker* molekuler mendapat perhatian khusus karena banyak membantu mengidentifikasi sel. Mekanisme ini dapat mempertahankan “stemness” atau gerakan diferensiasi yang telah diuraikan dengan teknik untuk isolasi dan kultur (Takacs, 2009; Girolamo, 2011).

Telah diketahui bahwa tidak semua penderita Limbal Stem Cell deficiency (LSCD) dengan SDE mempunyai gejala dan tanda klinis yang sama. Bila diagnosa berdasar gejala dan tanda klinis saja merupakan hal yang sulit. Selain itu, jenis pengobatan akan bekerja pada satu bagian tertentu dari penderita. Jika diagnosa penderita dikelompokkan bersama, pengobatannya tampak tidak efektif. Pada sel punca epitel kornea atau sel punca limbal (LSC), identifikasi *marker* sangat penting sebagai validasi kandidat *marker* secara cepat dan terpercaya. *Marker* juga penting untuk memperbaiki dan melengkapi kriteria diagnostik penyakit (Ganji, 2005; Figueira, 2007).

Dalam menetapkan suatu protein atau kelompok protein sebagai *marker* untuk tipe sel spesifik atau penyakit tidak ada kriteria standar. Pada sel punca epitel kornea atau sel punca limbal, telah dikemukakan kriteria *marker* sebagai berikut:





pertama, *marker* tidak harus ada secara eksklusif pada sel di permukaan mata, dapat ada atau tidak ada; yang harus ada adalah tunggal atau dalam kombinasi dan dipercaya, yang berarti bisa diperkaya dan/atau diisolasi dari LSC. Kedua, *marker* dapat sebagai identifikasi LSC dari jaringan asalnya pada individu sehat. Ketiga, banyaknya LSC yang mengandung *marker* harus tetap relatif konstan melalui kehidupan organisme dari individu yang sehat. Pengobatan atau keadaan yang meningkatkan sel proliferasi pada epitel kornea dalam jangka panjang tidak meningkatkan jumlah ekspresi *marker* LSC. Keempat, pada individu dengan LSCD, *marker* diidentifikasi lebih sedikit pada LSC. Sejak *marker* teridentifikasi, isolasi sel diperlukan untuk menunjukkan bukti atau sifat *stemness*. Hal ini harus dikerjakan pada LSC dengan teliti karena digunakan untuk populasi sel punca *adult* lainnya, dan termasuk demonstrasi repopulasi dalam jangka lama, restorasi kejernihan kornea, ekspresi *marker* spesifik kornea seperti K3 dan K12 serta menunjukkan tanda *clonogenicity*, *in vitro*.

Meskipun *marker* LSC telah diketahui, sejauh ini tidak ada satupun yang sesuai kriteria di atas, bagaimanapun beberapa molekul telah diduga kemungkinan sebagai *marker*. *Marker* dibagi dalam dua kategori: *marker* positif dan negatif (Ganji, 2005; Miguel, 2011).





Tabel 2.2. Putative *markers* pada sel punca limbal (LSC) ( Ganji, 2005).

Marker	Limbal region
<b>Keratins</b>	
K3/K12	-
K5/K14	+
<b>Gap junction proteins</b>	
Cx43	-
Cx60	-
<b>Integrins</b>	
$\beta$ 1 integrin	+
$\beta$ 4 integrin	+
$\alpha$ 5 integrin	+
$\alpha$ 9 integrin	+
<b>Metabolic enzymes</b>	
$\alpha$ -glucosidase	+
Cytochrome oxidase	+
Carbonic anhydrase	+
<b>Transporters</b>	
Glucose transporter I	+
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	+
ABCG2	+
<b>Growth factor receptors</b>	
EGF receptor	+
TGF- $\beta$ receptor VII	+
<b>Cell cycle mediators</b>	
Cyclin D	+
Cyclin E	+
<b>Others</b>	
p63	+

Marker negatif adalah *marker* dengan tidak didapatkannya ekspresi atau ekspresinya sedikit pada sel basal limbal. Misalnya pasangan keratin K3/K12 tidak didapatkan pada regio limbal tapi ditemukan pada kornea sentral. Tidak adanya K3/K12 digunakan sebagai *marker* LSC. Bagaimanapun, keratin adalah protein intraseluler dan tidak ideal sebagai *marker*, sel tersebut berdasar pada ekspresi protein intraseluler yang memerlukan permeabilitas sel. *Marker* positif adalah molekul dengan ekspresi banyak pada regio limbal dibanding dengan regio lain di permukaan mata. Misalnya, pada kornea manusia pasangan keratin K5/K14 terekspresi dalam sel basal limbal tetapi tidak ada pada kornea sentral (Ganji, 2005; Miranda, 2011).

Reseptor GF seperti reseptor EGF, reseptor I,II TGF  $\beta$  pada limbal terdapat ekspresi yang banyak. Hal ini sama seperti pada p63 yang merupakan suatu faktor





transkripsi dan termasuk juga p53 dan p73. Meskipun tidak ada satupun molekul yang tampak sebagai *marker* difinitif pada LSC, tetapi masih memungkinkan dengan menggunakan suatu kombinasi *marker* positif dan negatif. Penemuan *marker* LSC akan mempercepat isolasi dan kultur LSC, dan memfasilitasi transplantasi, seperti pada terapi LSCD. Perkembangan di masa mendatang, identifikasi *marker* pada permukaan sangat diperlukan tetapi saat ini masih banyak yang harus diketahui, diteliti dan dikerjakan (Ganji, 2005; Miranda, 2011).

#### 2.1.11.4.1. *Marker* sitokeratin

Dari hasil studi disebutkan bahwa sel epitel permukaan mata mempunyai *marker* yang karakteristik pada jaringan spesifik berupa antigen keratin dari filamen intermediet. Menurut Miranda (2011) kandidat yang baik sebagai *marker* adalah sitokeratin. Dibagi menjadi dua sub famili: tipe I (Asam) dan tipe II (Netral). Sitokeratin membentuk suatu filamen yang mempunyai respon terhadap integritas struktur sel epitel, dan terdapat perbedaan pada pola ekspresinya, sehingga protein ini dapat digunakan sebagai diferensiasi *marker*. Sebagian besar sitokeratin tipe I terdiri dari protein asam yang diatur dalam sepasang rantai keratin heterotipik.

Sitokeratin tipe 1 dikelompokkan dalam regio dari kromosom 17q21.2. Alternatif *splicing* dari gen ini menghasilkan varian transkripsi multipel; tetapi tidak semua varian dapat diuraikan (Miranda, 2011; Nubile, 2013).

Saat ini telah berkembang tentang identifikasi *marker* yang tereksresi di epitel konjungtiva, bukan pada epitel kornea. Keratin 13 (K13; CK 13), merupakan protein yang dikode dengan gen, yaitu suatu anggota dari famili gen keratin.

Disebutkan bahwa ekspresi sitokeratin K13 dan K12 terdapat pada OS, sehingga *marker* yang lebih spesifik pada sel epitel konjungtiva dan limbal sangat diperlukan





untuk mendeteksi sel epitel non kornea pada OS. Secara imunohistokimia, K13 terekspresi pada epitel konjungtiva dan epitel limbal posterior tetapi tidak didapatkan di kornea, sedang K12 terekspresi pada kornea dan epitel limbal anterior kecuali pada lapisan basal dan tidak didapatkan pada konjungtiva (Miranda, 2011).

Keratin-13 (K13) merupakan keratin asam utama, yang terekspresi pada lapisan suprabasal dari epitel stratifikasi non keratinisasi dan pada mukosa spesifik.

Selain itu K13 juga terdapat pada lapisan suprabasal pada hampir semua epitel skuamosa stratifikasi, seperti pada epitel mukosa dan epidermis yang regenerasi.

Hasil studi sebelumnya secara histologi dan kultur jaringan menunjukkan bahwa K13 terekspresi pada epitel konjungtiva dan limbal, tetapi pola ekspresi secara detail pada kornea perifer dan sentral, dan limbal tidak diteliti. Penemuan ekspresi K12

dan K13 sangat menguntungkan pada permukaan mata sehingga K13 merupakan *marker* potensial sel epitel dan bukan fenotip kornea. Hal ini penting karena tanda

klinis pada tahap awal LSCD cenderung tidak jelas dan tidak spesifik. Sel goblet tidak selalu ada dan dengan metode standar sitologi impresi sering salah. Deteksi

sel epitel non kornea, serta pada kornea perifer, akan lebih sensitif dan merupakan metode spesifik dalam mendiagnose LSCD awal. Selanjutnya, keberhasilan dalam

mendeteksi K13 dan K12 dengan *immunostaining* pada spesimen sitologi impresi menunjukkan bahwa K13 digunakan sebagai *marker* diagnostik dari epitel konjungtiva (Miranda, 2011; Nubile, 2013).

Ekspresi K3/12 (K3 keratin dasar 64000Da; K12 keratin asiditas 55000 Da) menjadi tanda sel epitel kornea. Bagaimanapun spesifisitas kornea K3 masih dipertanyakan, sehingga ekspresi K3/12 pada epitel permukaan mata tidak sesuai dengan dogma saat ini (Ganji, 2005; Miranda, 2011).





#### 2.1.11.4.2. Faktor Transkripsi p63

Faktor transkripsi p63 mempunyai peran penting pada sel proliferasi selama morfogenesis epitel. Defisiensi p63 pada *mice* menunjukkan bahwa terdapat defek limbal dan tidak mampu memproduksi epitel skuamosa, yang berarti merupakan kegagalan mendukung sel progenitor. Dari 6 isoform yang berbeda pada p63, spesies  $\Delta Np63\alpha$  adalah paling spesifik dalam mengidentifikasi LSC *resting healthy* limbus. Pada sebagian besar sel basal limbal didapatkan  $\Delta Np63$ . Arpitha (2008)

melaporkan bahwa hasil studi dengan imunohistokimia menampakkan bahwa nukleus sel epitel stratifikasi di lapisan basal tercat kuat dengan p63. Pada sebagian besar penelitian dengan 4A4 monoklonal antibodi, semua isoform p63 dikenali.

Protein p63 yang diamati di nukleus sel epitel kornea sebagai phosphoform terjadi pada diferensiasi keratinosit. Konsep yang lain yaitu berhubungan dengan ekspresi

dan fungsi p63 pada sel punca. *Primary splice variant* p63,  $\Delta Np63\alpha$  berfungsi merepresi transkripsi dengan berikatan pada promotor 14-3-3 $\sigma$ . Hasilnya, selama diferensiasi epitel terdapat reduksi ekspresi  $\Delta Np63\alpha$  yang berhubungan dengan peningkatan ekspresi protein 14-3-3 $\sigma$  (diketahui sebagai marker diferensiasi epitel), sehingga dalam fungsi sel punca p63 merupakan faktor yang penting (Arpitha, 2008; Jerome, 2011)

Hasil penelitian Arpitha (2008) diuraikan bahwa sel dengan ekspresi protein p63 yang tinggi juga terlihat pada kornea perifer sehingga untuk mengidentifikasi bagian limbal yaitu sel dengan fenotip sel punca, dengan suatu parameter tunggal tidak tepat. Sel punca diketahui sebagai sel yang kecil, struktur dan biokimia primitif dengan granula sedikit. Berdasar uraian di atas, maka dengan dua parameter-ekspresi p63 banyak dengan kombinasi N/C rasio besar merupakan suatu marker





tepat untuk sel punca epitel kornea. Metode ini dapat sebagai dasar penjelasan adanya sinyal *microenvironment* dan identifikasi mekanisme regulator untuk mempertahankan *stemness*, gen regulator untuk epitelial *growth* dan diferensiasi. Sehingga digunakan sebagai dasar pada terapi regeneratif, evaluasi, dan menseleksi keadaan kultur yang tepat dalam ekspansi *exvivo* sel punca epitel kornea (Arpitha,2008; Jerome, 2011).

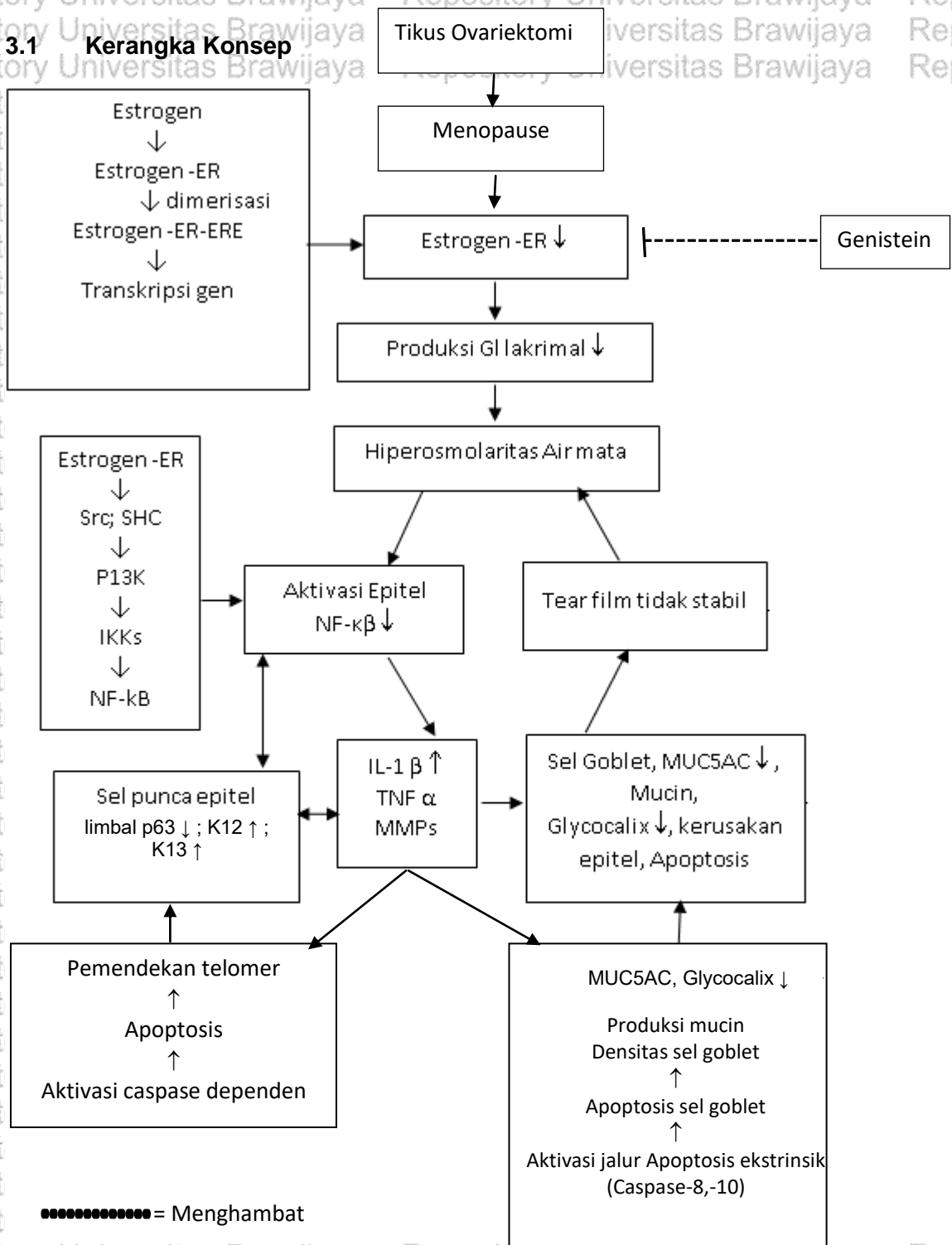




BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konsep





Hipotesis pada penelitian ini dibangun berdasarkan konsep dasar sebagai berikut:

Dengan ovariectomi, tikus wistar betina yang mempunyai maturitas seksual antara 1,5- 3 bulan mengalami kemunduran perkembangbiakan akibat berkurangnya level estrogen dan terjadi menopause. Defisiensi estrogen menyebabkan kelenjar lakrimal terjadi kerusakan sel asini, regresi kelenjar, apoptosis, terjadi defisiensi akuos, serta hiperosmolaritas airmata. Patogenesis SDE diuraikan sebagai suatu *vicious circle*, adanya disfungsi glandula lakrimal, terjadi hiperosmolaritas airmata, dan mediator proinflamasi meningkat, serta ketidakstabilan airmata yang selanjutnya pada epitel permukaan mata terganggu, mengalami disfungsi atau penyakit. Hal ini yang digunakan sebagai petunjuk diagnosis dan terapi SDE.

Komplek estrogen-RE dalam sel epitel permukaan mata akan menurun. Efek fisiologi estrogen melalui RE intraseluler. Epitel konjungtiva bersifat estrogen-sensitiv. Epitel superfisial konjungtiva dilapisi oleh TF merupakan unsur utama permukaan mata. Mekanisme kerja ikatan hormon dengan RE mempunyai konsekuensi terhadap selektivitas fungsi ligan. Fungsi utama RE adalah sebagai faktor transkripsi DNA-*binding* yang meregulasi ekspresi gen. Penetapan hasil akhirnya tergantung tipe dominan dari ikatan reseptornya, *nature of binding*, dan afinitas senyawa reseptornya. Pada keadaan hormon tidak ada, RE terletak di sitosol. Ikatan hormon dengan RE menyebabkan perubahan konformasi reseptor, mengawali serial peristiwa yang dimulai dengan migrasi reseptor dari sitosol ke nukleus, dimerisasi reseptor, dan akibatnya reseptor dimer berikatan ke hormon respon elemen pada DNA. DNA/reseptor kompleks selanjutnya merekrut atau mengarahkan transkripsi protein co-aktivator atau co-repressor,





dimana dapat meningkatkan aktivasi atau represi hormon respon gen. RE tampak mempunyai berbagai fungsi biologis dan respon yang berbeda terhadap berbagai senyawa estrogen. Ligan yang sama agonis pada beberapa jaringan (dimana yang dominan co-represor protein) dan antagonis pada jaringan lain.

NF-kB merupakan regulator utama dalam proses inflamasi. NF-kB juga berperan pada *epithelial-mesenchymal transition*. Hiperosmolaritas mengaktifasi jalur NF-kB di epitel permukaan mata dan sel epitel limbal. Secara molekuler terdapat *cross-talk* antara kelompok faktor transkripsi, dimana faktor transkripsi RE juga diketahui sebagai mediasi inhibisi aktivitas NF-kB pada beberapa level. *Cross-talk* antara keduanya tersebut merupakan regulator penting pada sistim endokrin dan imun untuk terapi penyakit inflamasi, kanker, imun. Pada tahap menstimulasi *cascade* inflamasi pada sel epitel permukaan mata, terjadi sinyal pathway NF-kB dan mengakibatkan peningkatan sitokin inflamasi antara lain IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . Pada fibroblas kornea IL-1 $\beta$  diaktivasi NF-kB. Adanya ikatan pada promotor target gen, NF-kB mengontrol ekspresi beberapa gen yang terlibat dalam proses imunitas, inflamasi, respon stress, diferensiasi, sel *survival*, dan apoptosis.

Diuraikan bahwa peningkatan ekspresi NF-kB; sitokin antara lain IL-1 $\beta$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$  memicu terjadinya inflamasi pada kornea dan konjungtiva. Peningkatan TNF- $\alpha$  sebagai salah satu *death ligand* akan menyebabkan aktivasi jalur apoptosis ekstrinsik melalui caspase yang berakhir pada apoptosis sel goblet konjungtiva sehingga terjadi penurunan densitas sel goblet dan menyebabkan penurunan produksi musin MUC5AC sehingga terjadi gangguan ekspresi musin MUC5AC yang menyebabkan TF tidak stabil.

Pada SDE, inflamasi kronis permukaan mata mengaktifasi gen yang respon terhadap diferensiasi, seperti keratin. Hiperkeratinisasi epitel konjungtiva





dan kornea menghasilkan permukaan yang tidak *wettable* dan lubrikasi yang jelek, menghasilkan peningkatan inflamasi dengan siklus yang terus menerus dan menurunkan produksi airmata, sehingga pada SDE terjadi perubahan patologi dengan keadaan hiperproliferasi dan diferensiasi epitel konjungtiva. Ekspresi sitokeratin K13 dan K12 terdapat pada permukaan mata. K13 terdapat di lapisan suprabasal pada epitel skuamosa stratifikasi. K13 terekspresi pada epitel konjungtiva dan epitel limbal posterior tetapi tidak didapatkan di kornea, sedang K12 terekspresi pada kornea dan epitel limbal anterior kecuali pada lapisan basal dan tidak didapatkan pada konjungtiva.

Fungsi reseptor nuklear meregulasi *stemness* atau diferensiasi sel punca. Kelompok reseptor nuklear RE, yang sebagian besar berupa ligan mengaktifasi faktor transkripsi, terlibat berbagai proses fisiologis termasuk regulasi diferensiasi sel punca. Sel epitel konjungtiva dan kornea berpotensi penting untuk generasi dan mempertahankan niche sel punca. Limbal merupakan sumber utama regenerasi sel epitel kornea dan sel epitel konjungtiva selain itu sebagai suatu barrier antara epitel kornea dan epitel konjungtiva. Pada inflamasi di dapatkan perubahan patologi struktur anatomi dan *marker* dari niche sel punca limbal, dimana pada jaringan patologis yang dianalisa dengan double imunohistokmia untuk integrin dan p63 menunjukkan penurunan ekspresi.

Defisiensi p63 pada *mice* menunjukkan defek limbal dan tidak mampu memproduksi epitel skuamosa, yang berarti merupakan kegagalan mendukung sel progenitor. Sedangkan p63 paling spesifik dalam mengidentifikasi sel punca limbal pada keadaan *resting healthy* limbus. Selain itu nukleus sel epitel stratifikasi di lapisan basal tercatat kuat dengan p63.





Berdasar uraian tentang sel punca tersebut sehingga dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan kombinasi ekspresi marker sitokeratin K12, K13 dan p63, pada sel punca epitel limbal.

Mekanisme fitoestrogen dapat melalui RE pada sel permukaan atau berinteraksi dengan GF dan *cytokine signalling pathways*. Fitoestrogen dapat memodulasi respon terhadap GF atau *activate/inhibit* kinase yang dapat merubah *ligand-independent transcriptional activity* dari RE atau faktor transkripsi lain seperti AP-1 dan NF- $\kappa$ B. Diketahui juga bahwa estrogen dapat menghambat inflamasi dengan 2 mekanisme, meningkatkan sintesis I $\kappa$ B $\alpha$  sehingga mengakselerasi *negative feedback loop* pada sinyal NF- $\kappa$ B, dan secara direk inhibisi ikatan NF- $\kappa$ B ke promotor gen inflamasi.

Genistein memiliki struktur kimia yang serupa dengan 17 $\beta$ -estradiol, maka pada kondisi hipoestrogen atau menopause, genistein dapat menggantikan 17 $\beta$ -estradiol sebagai ligand yang berikatan dengan RE, meskipun afinitasnya lebih rendah dibanding estrogen. Komplek RE-genistein akan menghambat aktivasi promotor gen sitokin proinflamasi, sehingga ekspresi sitokin proinflamasi (khususnya IL-1 $\beta$  sebagai mediator inflamasi yang poten) akan menurun, dan proses inflamasi pada kornea dan konjungtiva juga akan menurun. Proses apoptosis sel goblet konjungtiva menurun sehingga produksi musin akan meningkat. Penurunan inflamasi pada kornea dan konjungtiva serta peningkatan produksi musin diharapkan dapat memperbaiki permukaan mata. Pada literatur disebutkan bahwa respon anti inflamasi flavonoid tidak ada mekanisme definitif atau *single* sehingga menerangkan bahwa semua efek phenol mempunyai sinyal spesifik dan tergantung dari tipe sel.

Dari uraian tersebut di atas maka terdapat pengaruh hubungan yang saling berkaitan antara SDE dengan semua variabel yang akan diteliti yaitu RE-





NF-kB, IL-1 $\beta$ , MUC5AC, K12, K13 dan p63 serta pengaruhnya setelah terapi sehingga di masa mendatang genistein dapat menjadi bahan pertimbangan sebagai strategi terapi SDE.

### 3.2. Hipotesa penelitian

Genistein topikal berpengaruh terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi melalui peran RE  $\beta$ ; NF-kB; IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC5AC sel goblet konjungtiva; K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal.

#### 3.2.1. Sub hipotesa penelitian

1. Terdapat perbedaan ekspresi seluler RE $\beta$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
2. Terdapat perbedaan ekspresi seluler NF-kB sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
3. Terdapat perbedaan ekspresi seluler IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
4. Terdapat perbedaan ekspresi seluler MUC5AC sel goblet konjungtiva terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
5. Terdapat perbedaan ekspresi seluler K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE pada tikus model dengan ovariektomi dan setelah perlakuan genistein topikal.
6. SDE pada tikus model ovariektomi, dengan perlakuan genistein topikal berbagai dosis, akan memberikan pengaruh terhadap ekspresi seluler





RE $\beta$ ; NF-kB; dan IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; ekspresi seluler MUC5AC pada sel goblet konjungtiva; ekspresi seluler K12,K13 dan p63 sel punca epitel limbal.









## BAB 4

### METODOLOGI PENELITIAN

Secara keseluruhan, penelitian dilakukan dalam 2 tahap, yaitu tahap 1) Setelah tikus mengalami ovariektomi 1 bulan, dilakukan tes diagnostik SDE. Bila SDE, diberi genistein topikal 4x sehari setetes masing masing per kelompok perlakuan dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  selama 1 minggu; dan dilakukan pemeriksaan tes diagnostik SDE ulang; tahap 2) Pada semua kelompok dilakukan pemeriksaan immunostaining serta ekspresi seluler RE $\beta$ ; NF-kB; dan IL-1 $\beta$ ; pada sel epitel konjungtiva; ekspresi seluler MUC5AC pada sel goblet konjungtiva; ekspresi seluler, K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal; serta dengan *Path Analysis* untuk mengetahui perbandingan besarnya pengaruh genistein topikal melalui peran RE- $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC-5AC sel goblet konjungtiva serta K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE.

#### 4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *True Experimental Design* dengan desain *The post test-only control group*. Dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan membandingkan hasil yang didapat pada kelompok perlakuan berdasar dosis genistein topikal dan kelompok kontrol. Setelah tikus mengalami ovariektomi 1 bulan, dilakukan tes diagnostik SDE. Bila SDE, diberi genistein topikal 4x sehari setetes masing masing per kelompok perlakuan dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  selama 1 minggu dan dilakukan pemeriksaan tes diagnostik SDE ulang. Kemudian dilakukan bedah bola mata dengan tehnik enukleasi. Setelah deparafinisasi dan





pengecatan imunofluoresen, pemeriksaan preparat RE $\beta$ ; NF-kB; dan IL-1 $\beta$ ; pada sel epitel konjungtiva; MUC5AC pada sel goblet konjungtiva; K12, K13 sel punca epitel limbal dilakukan dibawah mikroskop konfokal. Setelah dilakukan deparafinisasi dan pengecatan imunohistokimia pemeriksaan preparat p63 sel punca epitel limbal dilakukan dibawah mikroskop cahaya.

*Path Analysis* untuk mengetahui perbandingan besarnya pengaruh genistein topikal melalui peran RE- $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC-5AC sel goblet konjungtiva serta K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE.

#### 4.2. Variabel penelitian dan definisi operasional

Variabel penelitian dan definisi operasional penelitian tahap 1 dan penelitian tahap 2 terdapat pada masing-masing bab pada tahap penelitian ini, yaitu dalam bab 5 dan bab 6.

#### 4.3. Jumlah sampel

Besaran sampel untuk penelitian eksperimental murni (*true experimental*), dihitung berdasarkan rumus :

$$\{(t-1)-(r-1)\} \geq 15$$

$$\{(5-1)-(r-1)\} \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Keterangan : r = ukuran sampel

t = banyaknya perlakuan





Dari rumus tersebut diperoleh ukuran sampel untuk masing-masing kelompok adalah 5 ekor tikus, sehingga yang dibutuhkan untuk penelitian ini berjumlah total 25 ekor tikus.

#### **4.4. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi dan Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; Laboratorium Sentral Ilmu Hayati-Fakultas Ilmu Biologi Universitas Brawijaya, di Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni - Desember 2015.

#### **4.5. Alat dan bahan penelitian**

Alat dan bahan penelitian yang diperlukan pada penelitian tahap 1 dan penelitian tahap 2 terdapat pada masing-masing bab pada tahap penelitian ini, yaitu dalam bab 5 dan bab 6.

#### **4.6. Prosedur penelitian**

Prosedur penelitian yang diperlukan pada penelitian tahap 1, penelitian tahap 2 terdapat pada masing-masing bab pada tahap penelitian ini, yaitu dalam bab 5 dan bab 6.

#### **4.7. Analisa Data**

Dalam penelitian ini teknik analisa data akan dilakukan tahapan penghitungan, berturut-turut yaitu: (1) uji normalitas data sampel pada semua variabel yang diamati dengan uji Kolmogorov Smirnov, dimana jika nilai signifikansi





(p) lebih besar dari alpha 0.05, maka dapat dikatakan bahwa data tersebut berdistribusi normal, (2) Uji homogenitas varian dengan uji Levene, dimana varian dikatakan homogen jika nilai signifikansi (p) lebih besar dari alpha 0,05, (3) apabila asumsi data telah terpenuhi maka dapat dilanjutkan dengan pengujian One way ANOVA. Selanjutnya jika dari hasil uji ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan, maka untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok dapat dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) yaitu Tukey. Namun apabila uji asumsi data yaitu normalitas dan homogenitas varians tidak terpenuhi maka pengujian dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dan Mann whitney. Perbandingan besarnya pengaruh genistein topikal melalui peran RE- $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC-5AC sel goblet konjungtiva serta K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE diketahui dengan menggunakan *Path Analysis*.

#### 4.7.1. Penelitian tahap 1

Diketahui bahwa tikus dengan ovariektomi 1 bulan yang telah dilakukan tes diagnostik pemeriksaan *Tear Film* yaitu tes Schirmer; tes Ferning serta tes FBUT dengan hasil SDE atau bila kedua tes hasilnya SDE maka didapatkan tikus model SDE. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan genistein dan 2 kelompok kontrol, sehingga menjadi 5 kelompok. Pada kelompok perlakuan menerima genistein topikal 4x sehari setetes selama 1 minggu, terdiri dari 3 kelompok ( pada masing- masing kelompok diberikan genistein 50  $\mu$ M, 100 $\mu$ M, dan 200  $\mu$ M) sedangkan kelompok kontrol positif (SDE dengan tikus model OVX), dan kelompok kontrol negatif ( tanpa OVX) diberi BSS. Selanjutnya setelah 1 minggu dilakukan tes diagnostik SDE ulang.





#### 4.7.2. Penelitian tahap 2

Pada semua kelompok dilakukan pemeriksaan: i) ekspresi seluler RE $\beta$  di sel epitel konjungtiva, ii) ekspresi seluler IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva, iii) ekspresi seluler NF-kB di sel epitel konjungtiva,iiii) ekspresi seluler MUC5AC sel goblet konjungtiva, iiiii) ekspresi seluler p63,K12,K13 sel punca epitel limbal dari semua kelompok dianalisa dengan uji one way ANOVA. Bila didapatkan hasil yang signifikan, dilakukan uji lanjut menggunakan uji-Tukey. Signifikansi statistik ditentukan jika nilai  $p \leq 0,05$ . Namun apabila uji asumsi data yaitu normalitas dan homogenitas varians tidak terpenuhi maka pengujian dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dan Mann whitney.

#### 4.7.3. Pembahasan umum

Untuk membuktikan perbandingan besarnya pengaruh genistein topikal melalui peran RE- $\beta$ , NF-kB, IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva; MUC-5AC sel goblet konjungtiva serta K12, K13 dan p63 sel punca epitel limbal terhadap SDE diketahui dengan menggunakan *Path Analysis*.

#### 4.8. Etika Penelitian

Penelitian ini mendapat *ethical clearance* dari Tim Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Secara in vivo, hewan coba diperlakukan sebaik mungkin supaya tidak menyakiti saat perlakuan. Proses pembedahan menggunakan metode anestesi yang tidak menyakiti hewan coba.





## BAB 5

### PENELITIAN TAHAP 1

#### Pemeriksaan tes diagnostik Sindroma Dry Eye pada tikus model Ovariektomi

##### 5.1. Pendahuluan

###### 5.1.1. Latar Belakang

Prevalensi SDE lebih tinggi pada wanita terutama pasca menopause.

Menopause ditandai dengan adanya perubahan level HSS yaitu penurunan produksi hormon terutama estrogen. Diduga terdapat peran estrogen terhadap patofisiologi SDE. Efektivitas terapi estrogen dalam memperbaiki gejala SDE hingga kini masih menjadi perdebatan (Nakkash, 2010; Ozcura, 2011).

Dengan ovariektomi, tikus wistar betina yang mempunyai maturitas seksual antara 1,5- 3 bulan mengalami kemunduran perkembangbiakan akibat berkurangnya level estrogen dan terjadi menopause. Hewan coba yang menyerupai SDE, kemungkinan mempunyai mekanisme patogenik berbeda dari SDE, hal ini karena mempunyai keadaan kompleksitas, kronisitas serta kelemahannya masing-masing..

Hormon mempunyai efek langsung dan tidak langsung pada jaringan eksokrin karena mempunyai kapasitas meregulasi imunitas seperti pada ekspresi gen dari beberapa sekresi molekul (Hertrampf, 2008; Wagh, 2012; Sivack, 2012).

Calcott (2012) melalui *Patent Application Publication* telah membuktikan metode hewan coba model SDE dengan OVX. Wagh (2012) menyimpulkan bahwa berbagai hewan coba seperti kelinci, tikus, kera, anjing, dengan parameter sedikit serta tipe validitas tertentu dapat digunakan secara pasti sebagai model SDE dan untuk meningkatkan prediksi terapi SDE. Li (2013) menetapkan keparahan model





SDE ringan, sedang, dan berat pada kelinci dengan tes Schirmer dan tes Fluoresin kornea (Lindberg, 2002; Calcott, 2012; Wagh, 2012; Li, 2013).

Tes diagnostik SDE digunakan untuk berbagai tujuan seperti penilaian persyaratan dalam *clinical trial* dan memantau perubahan secara kuantitatif, untuk mendiagnosis klinis praktis oleh oftalmologis, dan karakteristik SDE. Diagnosis SDE dilakukan dengan cara mengkombinasi antara informasi yang diperoleh dari pemeriksaan fisik dan hasil tes diagnostik. Pada pemeriksaan fisik, antara tanda klinis dan keluhan penderita SDE mempunyai korelasi yang jelek, sehingga diperlukan tes diagnostik multipel. Guna mendiagnosis SDE secara absolut pada umumnya dilakukan dua jenis tes atau lebih. Tidak ada tes *single* yang adekuat untuk menetapkan diagnosis SDE. Berdasarkan pelaksanaan dan hasil kualitas tes yang praktis, simpel, non invasif, bahan dan alat tersedia, dengan mempunyai spesifisitas dan sensitivitas dari masing-masing tes, maka pendekatan pragmatis dalam diagnosa SDE pada penelitian ini menggunakan tes Schirmer, tes Ferning dan Tes Fluoresin Break Up Time (FBUT) (DEWS, 2007; Ogawa, 2013; Phadataro, 2015)

Level estrogen (estradiol) signifikan dalam mempengaruhi fungsi okuler dan penglihatan terutama pada wanita tua. Kelainan yang berhubungan dengan keadaan ini seperti terdapat pada SDE, katarak, glaukoma, ARMD. Selain itu telah didiskusikan bagaimana estrogen digunakan sebagai terapi farmakologi pada menopause dan kanker mammae yang dapat berpengaruh pada patologi mata dan berbagai aspek psikofisikal pada penglihatan. Hasilnya telah diulas bahwa estrogen mempunyai dasar mekanisme potensial dengan efek menguntungkan, dengan dugaan sebagai anti-apoptosis dan efek vaskuler. Sedang dari tinjauan pustaka





telah diuraikan bahwa struktur kimia genistein serupa dengan  $17\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), namun afinitasnya 50-100 kali lebih lemah dibanding  $17\beta$ -estradiol. Selain itu disebutkan pula aktifitas farmakologi bioflavonoid dapat digunakan sebagai preventasi atau terapi penyakit okuler. Telah dilaporkan bahwa flavonoid menghambat beberapa mediator, yang teraktivasi dalam keadaan inflamatori tertentu seperti sitokin (Cooke 2006; Rice, 2006; Takeshi, 2006; Hutchinson, 2014).

Berdasar uraian diatas, sehingga dilakukan pemeriksaan tes diagnostik SDE pada tikus OVX dengan tujuan untuk membuktikan SDE pada tikus model OVX, selanjutnya pada kelima kelompok yaitu kelompok kontrol positif (SDE pada tikus model OVX); kelompok kontrol negatif (tanpa OVX) diberi perlakuan BSS serta tiga kelompok perlakuan genistein 4x sehari setetes selama 1 minggu dosis 50  $\mu$ M, dosis 100  $\mu$ M, dosis 200  $\mu$ M. Kemudian dilakukan tes diagnostik SDE ulangan pada semua kelompok, dengan tujuan mengetahui perbedaan atau perbandingan hasil tes diagnostik SDE antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein.

### 5.1.2. Rumusan Masalah

Apakah tes diagnostik SDE melalui pemeriksaan tes Schirmer; tes Ferning dan tes FBUT dapat mengetahui SDE pada tikus model OVX dan apakah terdapat perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M.?

#### 5.1.2.1. Sub Masalah

1. Apakah tes diagnostik SDE dengan hasil pemeriksaan tes Schirmer dapat mengetahui SDE pada tikus model OVX dan terdapat perbedaan antara





SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ?

2. Apakah tes diagnostik SDE dengan hasil pemeriksaan tes Ferning dapat mengetahui SDE pada tikus model OVX dan terdapat perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ?

3. Apakah tes diagnostik SDE dengan hasil pemeriksaan tes FBUT dapat mengetahui SDE pada tikus model OVX dan terdapat perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ?

### 5.1.3. Tujuan penelitian

Penelitian tahap 1 bertujuan untuk mengetahui SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes Schirmer; tes Ferning dan tes FBUT.

#### 5.1.3.1. Tujuan khusus

1. Untuk mengetahui SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes Schirmer

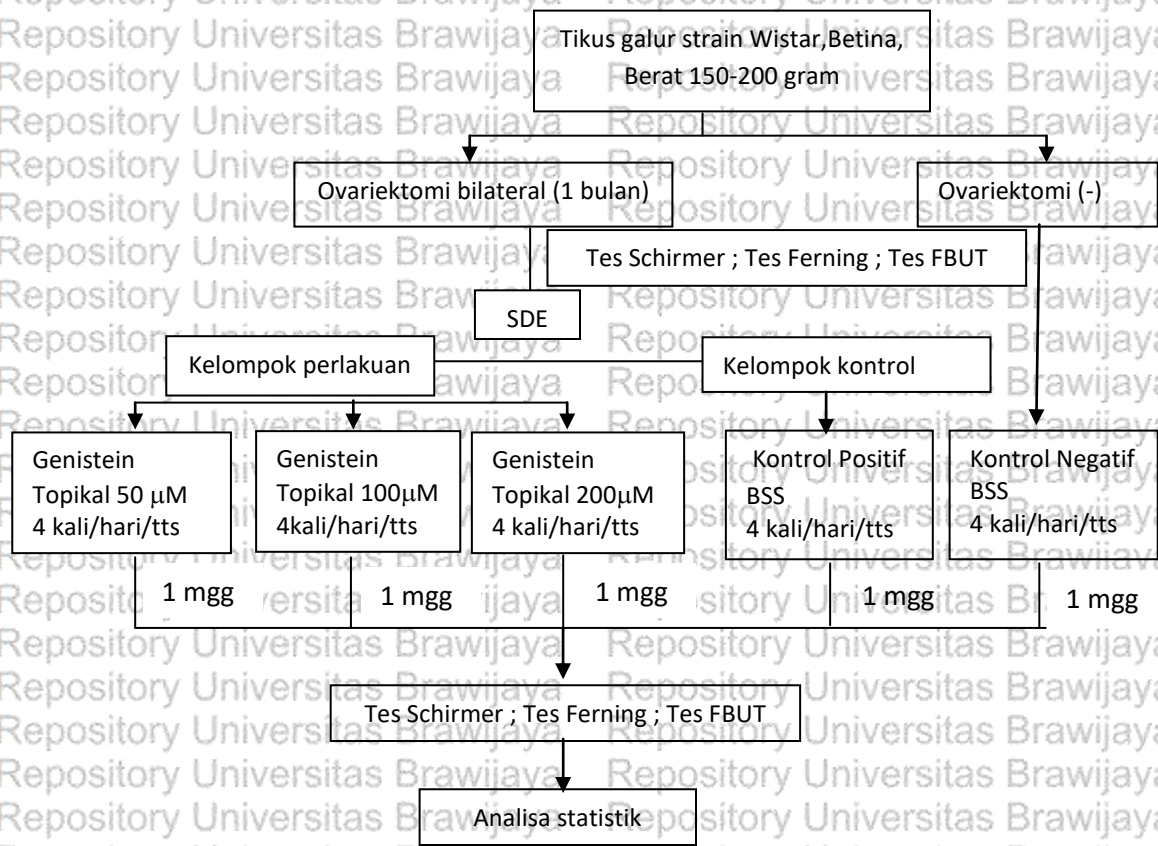
2. Untuk mengetahui SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes Ferning.





3. Untuk mengetahui SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes FBUT.

**5.2. Kerangka Konsep Penelitian Tahap 1**



**Gambar 5.1 Kerangka Konsep Penelitian Tahap 1**





### 5.3. Hipotesis penelitian

Terdapat SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes Schirmer; tes Ferning dan tes FBUT.

#### 5.3.1. Sub hipotesis penelitian

1. Terdapat SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes Schirmer.
2. Terdapat SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes Ferning.
3. Terdapat SDE pada tikus model OVX dan perbedaan antara SDE pada tikus model OVX dengan setelah perlakuan genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  melalui pemeriksaan tes FBUT.

### 5.4. Metode Penelitian

#### 5.4.1. Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-September 2015 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; Poli Mata RSSA; Klinik Mata Malang.





#### 5.4.2. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah hewan coba tikus galur strain Wistar betina, sehat, usia 3-4 bulan, berat 150-200 gram, sehat. Total 25 terbagi menjadi 5 kelompok. Kriteria eksklusi: peradangan pada mata atau mati selama penelitian.

#### 5.4.3. Variabel penelitian

Variabel bebas : genistein berbagai dosis

Variabel tergantung : tes Schirmer; tes Ferning dan tes FBUT.

#### 5.4.4. Definisi operasional

1. SDE pada tikus model OVX: Tikus dewasa OVX 1 bulan (Tikus pasca menopause) yang telah dilakukan tes diagnostik dengan pemeriksaan tes Schirmer; tes Ferning serta tes FBUT dengan hasil SDE atau bila kedua tes hasilnya SDE (Kontrol positif)
2. Tikus SDE dengan perlakuan genistein: SDE pada tikus model OVX, mendapat perlakuan genistein topikal 4x sehari setetes selama 1 minggu; dengan dosis 50  $\mu$ M, dosis 100  $\mu$ M, dosis 200  $\mu$ M.
3. Tes Schirmer : Interpretasi: normal *wetting* antara 10 -30 mm dari schirmer strip; SDE <10 mm.
4. Tes Ferning : Interpretasi : Tanda kristalisasi (ferning) atau daun pakis terdiri dari 4 tipe. Tipe 1) gambaran daun pakis yang seragam tanpa ruang kosong diantaranya. Satu pakis besar dengan cabang-cabang yang rapat. Tipe 2) gambaran daun pakis yang hampir sama dengan tipe 1, akan tetapi tiap kelompok pakis terdapat cabang yang lebih pendek dan terdapat ruangan kosong diantaranya. Tipe 3) gambaran sejumlah kecil pakis yang bisa dilihat, pakis berukuran kecil, regular dan tidak lengkap. Tampak ruangan-ruangan





besar yang kosong atau gumpalan musin yang tidak berbentuk. Tipe 4) tidak didapatkan adanya bentuk daun pakis. Musin tampak sebagai gumpalan atau jaras benang. Tipe 1 dan 2: normal; Tipe 3 dan 4: tidak normal atau buruk.

5. Tes FBUT: Normal > 10 detik; SDE  $\leq$  10 detik.

#### 5.4.5. Alat dan bahan penelitian

##### 5.4.5.1. Perawatan tikus

Alat perawatan tikus : kandang tikus masing-masing untuk 1 ekor tikus dan botol minum tikus. Bahan makanan: BR1 pakanan olahan ternak untuk memenuhi kecukupan nutrisi tikus dan kecambah kacang hijau; sekam. Minuman: tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diberi minum aquabides ad libitum.

##### 5.4.5.2 Pembuatan tikus ovariektomi

1. Tikus galur strain Wistar betina dianestesi menggunakan ketamin IM injeksi di paha 0,2 cc
2. Bulu bagian perut bawah dicukur dan kulit dibersihkan dengan betadine dan alkohol 70%.
3. Dilakukan insisi kulit lateral paralumbar 1-2 cm dan insisi otot di bawahnya 1-2 cm.
4. Kedua ovarium diikat dan dipotong , diberi betadine.
5. Kulit dan otot dijahit terpisah.
6. Pada hari 1, 2, dan 3 tikus diberi suntikan gentamisin intramuskular 0,3 cc dengan dosis 60-80 mg/kgBB perhari.

##### 5.4.5.3. Tes Schirmer

1. Definisi: Tes sekresi air mata atau volume air mata (akuos)





2. Bahan: Schirmer strip ( Tear Touch - Madu Instruments ISO 13485:2003 certified)

3. Metode: Mata tanpa anastesia. Schirmer strip diinsersi antara sepertiga lateral — pertengahan margin di palpebra bawah. Diamati pembasahan (*wetting*) pada kertas setelah 5 menit. Ambil kertas Schirmer strip dari culdesac inferior dan ukur *wetting* pada kertasnya dengan mm yang dimulai dari lipatan *notch* kertasnya. Selama tes, posisi mata ditutup.

#### 5.4.5.4. Tes Ferning

1. Definisi: Tes kualitas air mata atau karakteristik TF

2. Alat: Mikroskop cahaya (Olympus E 330-ADU12X, Japan); spatula/ gelas kapiler; gelas obyek/ slide; mikropipet

3. Bahan: air mata

4. Metode: Setetes air mata diambil dari meniskus bawah atau fornix inferior dengan mikropipet atau spatula. Sampel airmata ditetaskan pada gelas obyek. Dibiarkan mengering (5-10 menit) pada suhu kamar. Dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40-100x.

#### 5.4.5.5 Tes FBUT

1. Definisi: Tes stabilitas TF

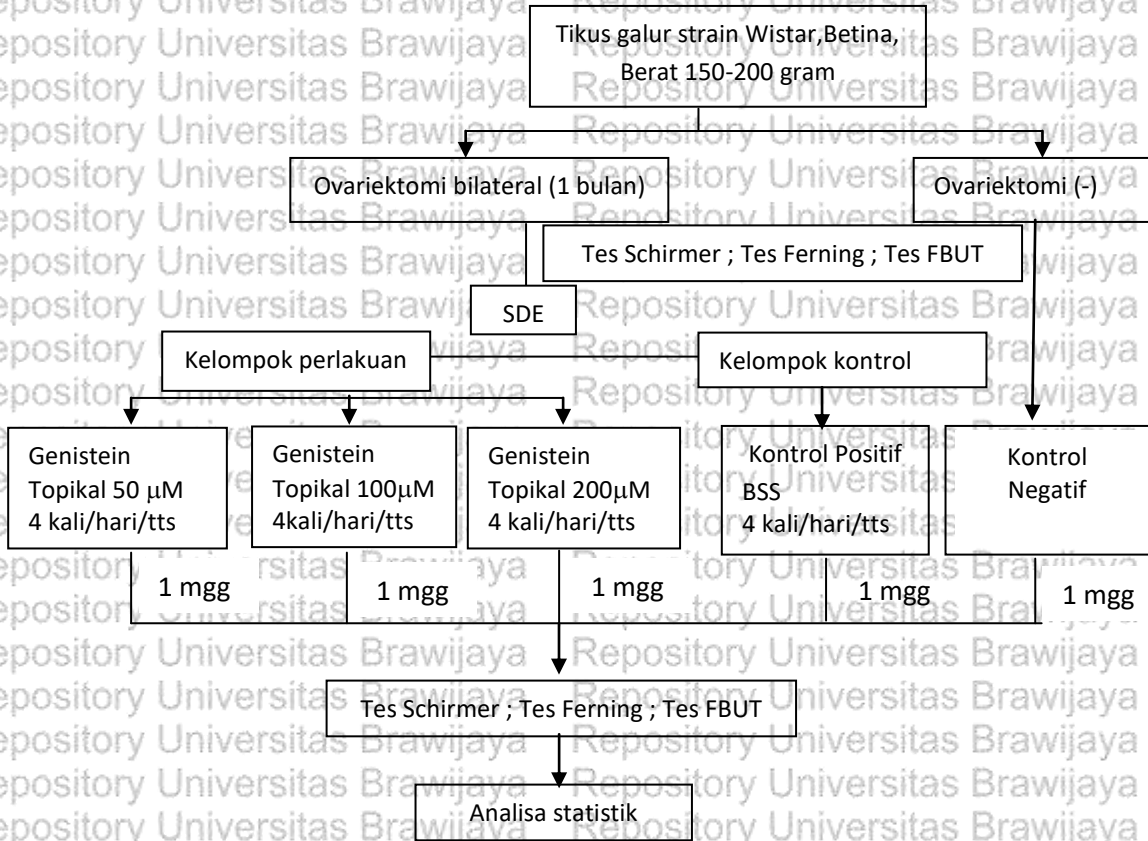
2. Alat dan bahan: *Timer*, Fluoresin strip ( Fluoro Touch-Madhu Instruments Mfg Lic No. S(0005)/10/ MB), Slit lamp (Inami) pembesaran 16x10 okuler.

3. Metode: Fluoresin strip dibasahi dengan setetes saline dan diaplikasikan ke cul-de-sac inferior. Waktu dihitung pada Interval antara di akhir kedipan dan awal tampak dry spot atau terputusnya TF. Diperiksa dengan *slit lamp* a *broad-beam* dengan filter biru pada penampakan *dry spot* awal di kornea.





### 5.5. Alur Penelitian Tahap 1



Gambar 5.2 Alur Penelitian Tahap 1

### 5.6. Hasil dan Pembahasan Penelitian Tahap 1

Telah diketahui bahwa jenis prosedur OVX pada hewan coba tikus dapat digunakan sebagai model studi pengaruh hormon terhadap struktur dan fungsi kelenjar lakrimal dan meibom. Prosedur ini tidak berarti diperoleh keadaan yang sama persis dengan SDE, tetapi yang penting diharapkan adalah tampak uraian aspek patogenik permukaan mata dan regulasi TF menyerupai SDE. Pada hewan coba, kelenjar lakrimal yang dipengaruhi efek hormonal terdapat beberapa variabel,





misalnya: spesies, jenis kelamin, umur, dan *strain*. Aspek penting lain yaitu prosedur eksperimentalnya sendiri (Wagh, 2012; Sivack, 2012).

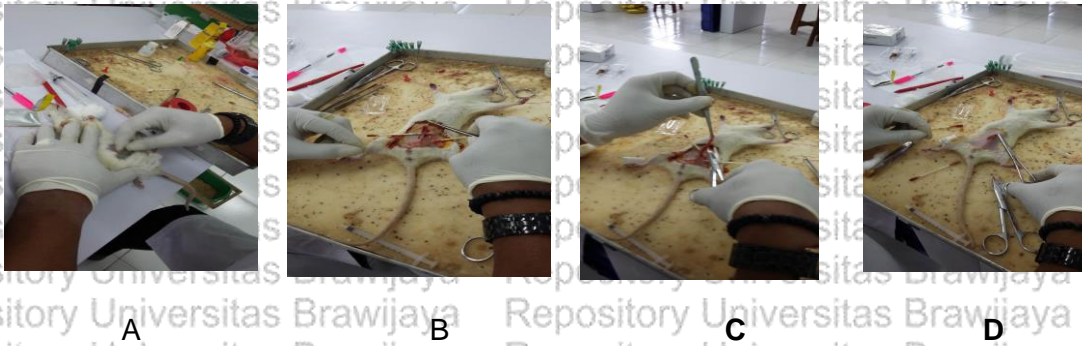
Pada penelitian ini menggunakan tikus Wistar betina dengan berat badan 150-200 gram, 3 bulan. Hal ini sesuai dengan literatur bahwa tikus wistar betina mempunyai maturitas seksual antara 1,5-3 bulan dan mempertahankan kemampuan berkembang biak sampai menopause, dimulai umur 14 bulan. Mulai mengalami kemunduran perkembangbiakan sekitar 9 bulan akibat berkurangnya level estrogen.

Usia tikus peri-menopause sekitar 9-14 bulan (Lindberg, 2002; Hertrampf, 2008; Wagh, 2012).

Pada penelitian didapatkan 1 tikus mati setelah hari pertama ovariektomi, 2 tikus mati setelah hari ketiga dan ke tujuh setelah ovariektomi. Jumlah sampel yang dapat mewakili dalam penelitian dapat ditambahkan  $\geq 10\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa jumlah hewan coba memenuhi kebutuhan jumlah sampel untuk dilakukan analisa statistik.

Pemotongan preparat pada penelitian dilakukan secara vertikal, sehingga diperoleh potongan conjungtiva, limbus, cornea, dan retina yang tampak dari hasil pengecatan HE dan Imunofluoresen. Pada tikus dewasa, distribusi sel goblet agak berbeda dengan manusia, dimana sel goblet hanya terdapat dalam bentuk kelompok sel, paling banyak didapatkan pada daerah fornix dengan penurunan bertahap ke arah conjungtiva bulbi dan orbita tidak didapatkan pada conjungtiva tarsal dan limbal (Tseng, 1998).





**Gambar 5.3 Ovariektomi.** A. Bulu bagian perut bawah dicukur dan kulit dibersihkan dengan betadine dan alkohol 70%. B,C Dilakukan insisi kulit lateral paralumbur 1-2 cm dan insisi otot di bawahnya 1-2 cm. Kedua ovarium diikat dan dipotong, diberi betadine. D.Kulit dan otot dijahit terpisah.

**Tabel 5.1. Hasil Pemeriksaan Diagnostik SDE pada tikus model OVX.**

Nomor sampel	Hasil Tes Schirmer	Hasil Tes Ferning	Hasil Tes FBUT	Kelompok	Hasil tes diagnostik
1	8.00	3.00	8.00	KP	SDE
2	9.00	4.00	7.00	KP	SDE
3	8.00	4.00	6.00	KP	SDE
4	9.00	3.00	10.00	KP	SDE
5	9.00	4.00	7.00	KP	SDE
6	9.00	4.00	9.00	P1 (50 uM)	SDE
7	9.00	4.00	10.00	P1 (50 uM)	SDE
8	12.00	4.00	9.00	P1 (50 uM)	SDE
9	11.00	2.00	8.00	P1 (50 uM)	SDE
10	8.00	3.00	8.00	P1 (50 uM)	SDE
11	11.00	3.00	12.00	P2 (100 uM)	SDE
12	9.00	3.00	14.00	P2 (100 uM)	SDE
13	12.00	4.00	9.00	P2 (100 uM)	SDE
14	14.00	3.00	12.00	P2 (100 uM)	SDE
15	12.00	3.00	13.00	P2 (100 uM)	SDE
16	14.00	3.00	12.00	P3 (200 uM)	SDE
17	12.00	2.00	11.00	P3 (200 uM)	SDE
18	12.00	2.00	11.00	P3 (200 uM)	SDE
19	14.00	2.00	14.00	P3 (200 uM)	SDE
20	11.00	3.00	13.00	P3 (200 uM)	SDE
21	12.00	3.00	14.00	KN	Tidak SDE
22	10.00	2.00	15.00	KN	Tidak SDE
23	15.00	2.00	10.00	KN	Tidak SDE
24	14.00	2.00	16.00	KN	Tidak SDE
25	14.00	2.00	18.00	KN	Tidak SDE
Total	N 25	25	25	25	25

Tidak ada tes *single* yang adekuat untuk menetapkan diagnosis SDE. Guna mendiagnosis SDE secara absolut pada umumnya dilakukan dua jenis tes atau lebih, sehingga pada penelitian ini menggunakan tes diagnostik dengan pemeriksaan tes Schirmer; tes Ferning serta tes FBUT dengan hasil SDE atau bila kedua tes hasilnya SDE (DEWS, 2007; Craig et al 2017).



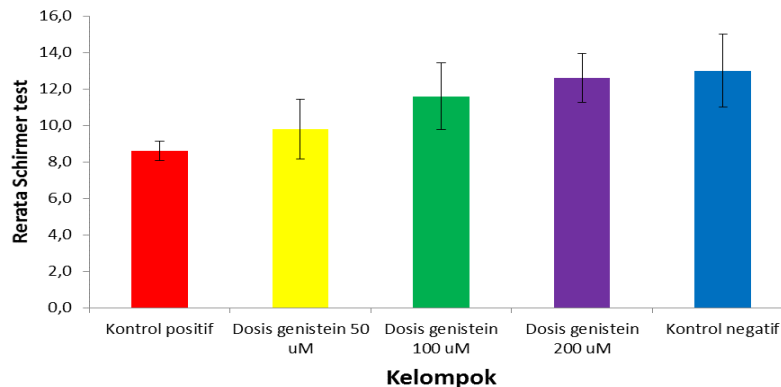


### 5.6.1 Hasil tes Schirmer

Tabel 5.2. Data hasil tes Schirmer

Kelompok	Ulangan sampel					Rata-rata	Std. dev.
	1	2	3	4	5		
KP	8	9	8	9	9	8.60	0.55
P1 (50 $\mu$ M)	9	9	12	11	8	9.80	1.64
P2 (100 $\mu$ M)	11	9	12	14	12	11.60	1.82
P3 (200 $\mu$ M)	14	12	12	14	11	12.60	1.34
KN	12	10	15	14	14	13.00	2.00

Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa adanya perbedaan dosis genistein memberikan pengaruh atau efek yang berbeda terhadap hasil tes Schirmer. Berdasarkan penilaian secara deskriptif, menurut rata-rata hasil tes Schirmer tersebut, dapat dikatakan bahwa perlakuan genistein dengan dosis 50  $\mu$ M hingga dosis 200  $\mu$ M akan meningkatkan hasil tes Schirmer. Adapun adanya perbedaan hasil tes Schirmer pada setiap kelompok perlakuan di atas juga dapat digambarkan dalam bentuk grafik sebagai berikut.



**Gambar 5.4. Perbandingan rerata tes Schirmer pada kelompok perlakuan dan kontrol.** Hasil tes Schirmer menjadi lebih tinggi setelah diberikan perlakuan genistein mulai pada dosis 50  $\mu$ M dibandingkan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol positif. Kemudian hasil tes Schirmer cenderung semakin tinggi ketika diberi dosis yang lebih tinggi yaitu 100  $\mu$ M dan dosis 200  $\mu$ M.





Berdasarkan hasil uji ANOVA pada tabel di atas untuk data hasil tes Schirmer, menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.001 ( $p < 0,05$ ), sehingga  $H_0$  ditolak, dan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil tes Schirmer pada kelompok perlakuan berupa genistein.

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji pembandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Tukey (*Tukey's Test*) sebagai salah satu uji pembandingan berganda yang mempunyai sensitivitas cukup tinggi dalam menguji adanya perbedaan antar perlakuan dalam *multiple comparisons*. Dengan metode ini akan dilakukan pembandingan yang berganda terhadap data hasil tes Schirmer antara setiap kelompok perlakuan genistein, dengan hasil sebagai berikut.

**Tabel 5.3. Uji Pembandingan Berganda Tukey untuk hasil tes Schirmer**

Pembandingan antar Kelompok	Beda rata-rata	Sig.	Keputusan	
KP	P1 (50 $\mu$ M)	-1.200	0.740	Tidak berbeda signifikan
	P2 (100 $\mu$ M)	-3.000	0.044	Berbeda signifikan
	P3 (200 $\mu$ M)	-4.000	0.005	Berbeda signifikan
	KN	-4.400	0.002	Berbeda signifikan
P1 (50 $\mu$ M)	P2 (100 $\mu$ M)	-1.800	0.385	Tidak berbeda signifikan
	P3 (200 $\mu$ M)	-2.800	0.067	Tidak berbeda signifikan
	KN	-3.200	0.029	Berbeda signifikan
P2 (100 $\mu$ M)	P3 (200 $\mu$ M)	-1.000	0.845	Tidak berbeda signifikan
	KN	-1.400	0.621	Tidak berbeda signifikan
P3 (200 $\mu$ M)	KN	-0.400	0.994	Tidak berbeda signifikan

Keterangan:

Jika nilai signifikansi ( $p$ )  $< \alpha 0.05$  = ada perbedaan yang signifikan

Jika nilai signifikansi ( $p$ )  $> \alpha 0.05$  = tidak ada perbedaan yang signifikan

Kemudian dari hasil uji pembandingan berganda (*Tukey's Test*) pada setiap perlakuan, menunjukkan bahwa antara rata-rata hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol positif (KP) berbeda signifikan (bermakna) dengan hasil tes Schirmer pada





kelompok yang diberi genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$ , dosis 200  $\mu\text{M}$  dan KN ( $p < 0.05$ ).

Tetapi hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol positif (KP) tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok yang diberi genistein pada dosis 50  $\mu\text{M}$  ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Schirmer pada kelompok yang diberi genistein pada dosis 50  $\mu\text{M}$  berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol negatif ( $p < 0.05$ ). Tetapi hasil tes Schirmer pada kelompok genistein dosis 50  $\mu\text{M}$  tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok genistein dosis 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol positif (KP) ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Schirmer pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol positif (KP) ( $p < 0.05$ ). Tetapi hasil tes Schirmer pada kelompok genistein dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol negatif ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol negatif (KN) berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok genistein dosis 50  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol positif (KP) ( $p < 0.05$ ). Hasil tes Schirmer pada kelompok kontrol negatif (KN) tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Schirmer pada kelompok genistein dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  ( $p > 0.05$ ).

Berdasarkan plot respon tersebut dapat dibentuk urutan dari efek perlakuan terhadap rata-rata hasil tes Schirmer dari urutan yang paling tinggi sampai dengan hasil tes Schirmer yang paling rendah, sebagai berikut.





**Tabel 5.4. Urutan rata-rata hasil tes Schirmer sebagai efek dari perlakuan genistein.**

No	Perlakuan Dosis Genistein	Rata hasil tes Schirmer (mean±std.dev.)
1	KN	13.0±2.0
2	P3 (200 µM)	12.6±1.34
3	P2 (100 µM)	11.6±1.82
4	P1 (50 µM)	9.8±1.64
5	KP	8.6±0.55

Pemberian genistein dosis 200 µM dapat meningkatkan hasil tes Schirmer dengan rata-rata yang paling rendah (mean=12.6 satuan) daripada pemberian genistein dosis yang lebih rendah yaitu dosis 100 µM, sehingga dosis 200 µM dapat lebih meningkatkan hasil tes Schirmer daripada dosis 100 µM. Namun pemberian genistein dosis 100 µM dapat lebih meningkatkan hasil tes Schirmer daripada dosis 50 µM, sehingga dosis 100 µM masih lebih baik daripada dosis 50 µM. Adapun perlakuan genistein pada dosis 50 µM masih lebih baik dalam meningkatkan hasil tes Schirmer daripada kontrol positif.

Berdasar uraian hasil diatas, hal ini sesuai dengan beberapa hasil penelusuran literatur yang menguraikan bahwa dengan hasil tes Schirmer >10mm hal ini bisa terjadi karena tes Schirmer tanpa anestesia adalah tes reflek sekresi air mata karena respon terhadap stimulasi konjungtiva. Reflek stimulasi aliran air mata terjadi sewaktu insersi kertas strip masuk saku konjungtiva. Penggunaan tanpa anestesia bertujuan mengukur reflek *tearing* dan *basic*. Pada pemeriksaan dengan mata ditutup selama 5 menit, sejumlah air mata membasahi kertas yang terukur dengan tanda panjangnya strip yang basah (Chen, 2011; Li, 2013).

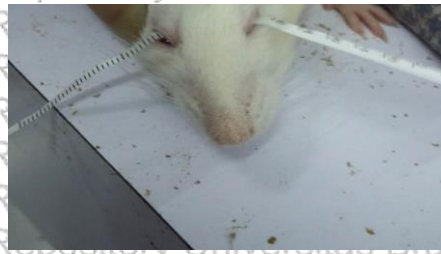
Hasil tes Schirmer reproduktivitasnya bervariasi karena adanya manipulasi kelopak mata, sehingga dapat merubah hasil tes. DEWS (2007) melaporkan tes





Schirmer nilai sensitivitas 85% dan spesifisitas 83%. Phadataré (2015) menguraikan, nilai pertanda diagnostik defisiensi akuos, tes Schirmer secara kuantitatif mengukur produksi airmata dari kelenjar lakrimalis selama periode waktu tertentu. Diagnosis atau eksklusi SDE tidak dapat dibuat berdasar tes schirmer saja (De Paiva, 2008; DEWS, 2007; Phadataré 2015).

Hasil tinjauan pustaka (Ogawa, 2013) menguraikan bahwa diagnosis SDE dilakukan dengan cara mengkombinasi antara informasi yang diperoleh dari pemeriksaan fisik dan hasil tes diagnostik. Menurut (DEWS, 2007) pada pemeriksaan fisik, antara tanda klinis dan keluhan penderita SDE mempunyai korelasi yang jelek, sehingga diperlukan tes diagnostik multipel. Pada penelitian ini karena menggunakan hewan coba, tidak melalui pemeriksaan fisik (Spoler, 2010; Ogawa, 2013)



**Gambar. 5.5.Tes Schirmer.** Kertas Schirmer dibagi menjadi 2 bagian memanjang. Pada tikus tampak air mata membasahi kertas yang terukur dengan tanda panjangnya strip yang basah





### 5.6.2. Hasil tes Ferning

**Tabel 5.5. Data hasil tes Ferning**

Kelompok	Ulangan sampel					Rata-rata	Std. dev.
	1	2	3	4	5		
KP	3	4	4	3	4	3.60	0.55
P1 (50 $\mu$ M)	4	4	4	2	3	3.40	0.89
P2 (100 $\mu$ M)	3	3	4	3	3	3.20	0.45
P3 (200 $\mu$ M)	3	2	2	2	3	2.40	0.55
KN	3	2	2	2	2	2.20	0.45

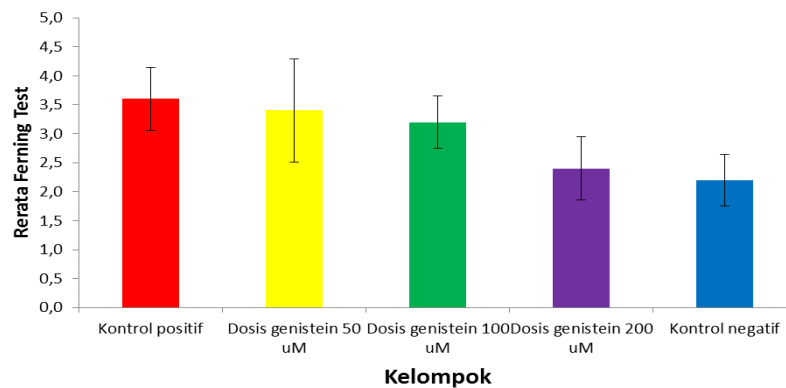
Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa adanya perbedaan dosis genistein memberikan pengaruh atau efek yang berbeda terhadap hasil tes Ferning.

Adanya pengaruh pemberian genistein tersebut mulai terlihat dimana hasil tes Ferning menjadi lebih rendah setelah diberikan perlakuan berupa genistein mulai pada dosis 50  $\mu$ M dibandingkan dengan hasil tes Ferning pada kelompok kontrol positif. Kemudian hasil tes Ferning cenderung semakin rendah ketika diberi dosis yang lebih tinggi yaitu 100  $\mu$ M. Kemudian hasil tes Ferning cenderung semakin rendah ketika diberi dosis yang lebih tinggi yaitu 100  $\mu$ M dan dosis 200  $\mu$ M.

Berdasarkan penilaian secara deskriptif, menurut rata-rata hasil tes Ferning tersebut, dapat dikatakan bahwa perlakuan genistein dengan dosis 50  $\mu$ M hingga dosis 200  $\mu$ M akan menurunkan hasil tes Ferning.

Adapun adanya perbedaan hasil tes Ferning pada setiap kelompok perlakuan di atas juga dapat digambarkan dalam bentuk grafik sebagai berikut.





**Gambar 5.6. Perbandingan rerata Tes Ferning pada kelompok perlakuan dan kontrol.** Pengaruh pemberian genistein terlihat dimana hasil tes Ferning menjadi lebih rendah setelah perlakuan genistein mulai pada dosis 50  $\mu\text{M}$  dibandingkan dengan hasil tes Ferning pada kelompok kontrol positif. Kemudian hasil tes Ferning cenderung semakin rendah ketika diberi dosis yang lebih tinggi 100  $\mu\text{M}$ . Kemudian hasil tes Ferning cenderung semakin rendah ketika diberi dosis yang lebih tinggi yaitu 100  $\mu\text{M}$  dan dosis 200  $\mu\text{M}$ .

Berdasarkan hasil uji ANOVA pada tabel di atas untuk data hasil tes Ferning, menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.004 ( $p < 0,05$ ), sehingga  $H_0$  ditolak, dan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil tes Ferning pada kelompok perlakuan genistein.

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Tukey (*Tukey's Test*) sebagai salah satu uji perbandingan berganda yang mempunyai sensitivitas cukup tinggi dalam menguji adanya perbedaan antar perlakuan dalam *multiple comparisons*. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang berganda terhadap data hasil tes Ferning antara setiap kelompok perlakuan genistein, dengan hasil sebagai berikut.



**Tabel 5.6. Uji perbandingan berganda Tukey hasil tes Ferning**

Perbandingan antar Kelompok		Beda rata-rata	Sig.	Keputusan
KP	P1 (50 $\mu$ M)	0.200	0.983	Tidak berbeda signifikan
	P2 (100 $\mu$ M)	0.400	0.827	Tidak berbeda signifikan
	P3 (200 $\mu$ M)	1.200	0.035	Berbeda signifikan
	KN	1.400	0.011	Berbeda signifikan
P1 (50 $\mu$ M)	P2 (100 $\mu$ M)	0.200	0.983	Tidak berbeda signifikan
	P3 (200 $\mu$ M)	1.000	0.101	Tidak berbeda signifikan
	KN	1.200	0.035	Berbeda signifikan
P2 (100 $\mu$ M)	P3 (200 $\mu$ M)	0.800	0.255	Tidak berbeda signifikan
	KN	1.000	0.101	Tidak berbeda signifikan
P3 (200 $\mu$ M)	KN	0.200	0.983	Tidak berbeda signifikan

Keterangan:

Jika nilai signifikansi ( $p$ )  $<$   $\alpha$  0.05= ada perbedaan yang signifikan

Jika nilai signifikansi ( $p$ )  $>$   $\alpha$  0.05= tidak ada perbedaan yang signifikan

Kemudian dari hasil uji perbandingan berganda (*Tukey's Test*) pada setiap perlakuan, menunjukkan bahwa antara rata-rata hasil tes Ferning pada kelompok kontrol positif (KP) berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 200  $\mu$ M dan KN ( $p < 0.05$ ). Hasil tes Ferning pada kelompok kontrol positif (KP) tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 50  $\mu$ M, dan 100  $\mu$ M ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Ferning pada kelompok genistein dosis 50  $\mu$ M berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok kontrol negatif ( $p < 0.05$ ). Hasil tes Ferning pada kelompok genistein dosis 50  $\mu$ M tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu$ M, dosis 200  $\mu$ M, dan kelompok kontrol positif (KP) ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu$ M tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein





pada dosis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , kontrol positif dan kelompok kontrol negatif ( $p>0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 200  $\mu\text{M}$  berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok kontrol positif ( $p<0.05$ ). Hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 200  $\mu\text{M}$  tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$ , dosis 50  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol negatif (KN) ( $p>0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes Ferning pada kelompok kontrol negatif (KN) berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 50  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol positif (KP) ( $p<0.05$ ). Hasil tes Ferning pada kelompok kontrol negatif (KN) tidak berbeda signifikan dengan hasil tes Ferning pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  ( $p>0.05$ ).

Berdasarkan plot respon tersebut dapat dibentuk urutan dari efek perlakuan terhadap rata-rata hasil tes Ferning dari urutan yang paling rendah sampai dengan hasil tes Ferning yang paling tinggi, sebagai berikut.

**Tabel 5.7. Urutan rata-rata hasil tes Ferning sebagai efek perlakuan genistein**

No	Perlakuan Dosis Genistein	Rata hasil tes Ferning (mean $\pm$ std.dev.)
1	KN	2.2 $\pm$ 0.45
2	P3 (200 $\mu\text{M}$ )	2.4 $\pm$ 0.55
3	P2 (100 $\mu\text{M}$ )	3.2 $\pm$ 0.45
4	P1 (50 $\mu\text{M}$ )	3.4 $\pm$ 0.89
5	KP	3.6 $\pm$ 0.55

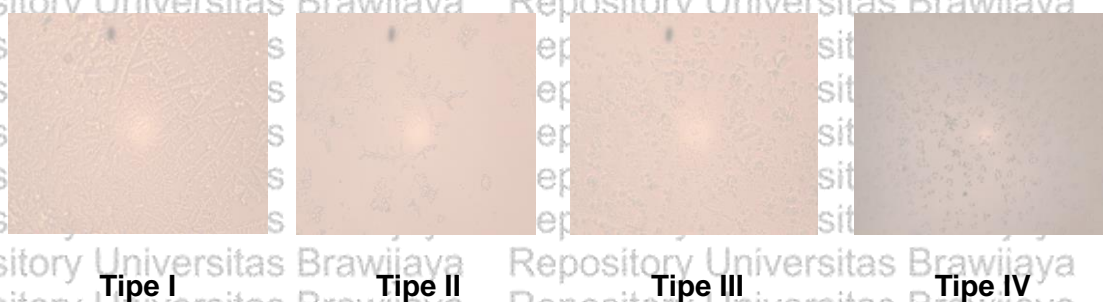
Perlakuan genistein pada dosis 200  $\mu\text{M}$  dapat menurunkan hasil tes Ferning dengan rata-rata yang paling rendah (mean=2.4 satuan) daripada genistein pada dosis yang lebih rendah yaitu dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 50  $\mu\text{M}$ , sehingga perlakuan genistein pada dosis 200  $\mu\text{M}$  mampu menurunkan hasil tes Ferning hingga menjadi





normal daripada hasil tes Ferning pada dosis 100  $\mu\text{M}$ . Perlakuan genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$  mampu menurunkan hasil tes Ferning hingga menjadi normal daripada hasil tes Ferning pada dosis 50  $\mu\text{M}$ . Namun genistein pada dosis 50  $\mu\text{M}$  dapat lebih menurunkan hasil tes Ferning daripada kontrol positif, sehingga dosis 50  $\mu\text{M}$  masih lebih baik daripada kontrol positif.

Epitel stratifikasi dan sel goblet konjungtiva menghasilkan musin. Pada mata dengan defisiensi akuos, epitel mengalami perubahan patologi, dengan tanda metaplasia skuamosa, penurunan densitas sel goblet. Selain itu menghasilkan defisiensi musin pada *Tear Film* dan menjadi tidak stabil. Ekspresi gugus musin MUC5AC dapat dinilai dengan imunostaining. Tes Ferning dapat digunakan untuk membantu diagnosis kualitas airmata/ musin, DES dan hiperosmolaritas. Pada SDE menunjukkan hasil tes Ferning tipe III dan IV. Tes Ferning mempunyai sensitivitas 90%, spesifisitas 83% pada SDE, dan spesifisitas yang sama dengan tes diagnostik lainnya (DEWS 2007; De Paiva, 2008; Masmali, 2014).



**Gambar 5.7. Tes ferning.** Hasil Tes Ferning tipe I,II,III,IV pada semua kelompok sampel penelitian.

Masmali (2014) menguraikan bahwa tes Ferning disebut juga sebagai pemeriksaan mukus airmata. Terminologi ini diharapkan adanya hubungan penyebab antara tanda ferning dan musin okular. Hipotesa terjadinya *fern* (kristalisasi) diduga karena





terdapat lokasi molekul organik (sulfur) pada *tear fern*. Ketika airmata kering, terjadi evaporasi airmata yang menyebabkan konsentrasi cairan dan protein tidak dapat lebih lama bertahan dan terdapat deposit pada pinggir tetesan airmata. Konsentrasi garam meningkat pula dan akan terjadi pembentukan spontan tanda *fern*-seperti kristal. Makromolekul seperti mucin dan protein tidak ada dalam struktur *fern*, sehingga tidak berperan langsung terhadap formasi *fern* (Masmali, 2014).

### 5.6.3. Hasil tes FBUT

**Tabel 5.8. Data hasil tes FBUT**

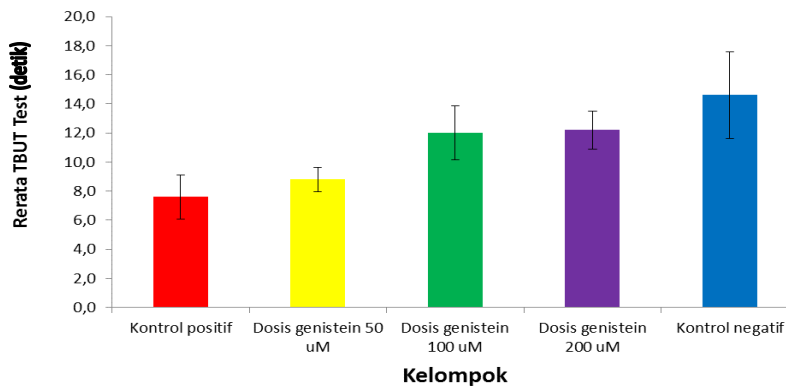
Kelompok	Ulangan sampel					Rata-rata	Std. dev.
	1	2	3	4	5		
KP	8	7	6	10	7	7.60	1.52
P1 (50 $\mu$ M)	9	10	9	8	8	8.80	0.84
P2 (100 $\mu$ M)	12	14	9	12	13	12.00	1.87
P3 (200 $\mu$ M)	12	11	11	14	13	12.20	1.30
KN	14	15	10	16	18	14.60	2.97

Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa adanya perbedaan dosis genistein memberikan pengaruh atau efek yang berbeda terhadap hasil tes FBUT.

Berdasarkan penilaian secara deskriptif, menurut rata-rata hasil tes FBUT tersebut dapat dikatakan bahwa pemberian genistein dengan dosis 50  $\mu$ M hingga dosis 200  $\mu$ M akan meningkatkan hasil tes FBUT.

Adapun adanya perbedaan hasil tes FBUT pada setiap kelompok perlakuan di atas juga dapat digambarkan dalam bentuk grafik sebagai berikut.





**Gambar 5.8. Perbandingan rerata tes FBUT pada kelompok perlakuan dan kontrol.** Adanya pengaruh pemberian genistein mulai terlihat dimana hasil tes FBUT menjadi lebih tinggi setelah diberi perlakuan genistein mulai pada dosis 50  $\mu\text{M}$  dibandingkan dengan hasil tes FBUT pada kelompok kontrol positif. Tes FBUT cenderung semakin tinggi ketika diberi dosis 100  $\mu\text{M}$ . Hasil tes FBUT cenderung semakin tinggi ketika diberi dosis lebih tinggi, 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$ .

Berdasar hasil uji ANOVA pada tabel di atas untuk data hasil tes FBUT, menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ), sehingga  $H_0$  ditolak, dan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil tes FBUT pada kelompok perlakuan genistein.

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji Tukey (*Tukey's Test*) sebagai salah satu uji perbandingan berganda yang mempunyai sensitivitas cukup tinggi dalam menguji adanya perbedaan antar perlakuan dalam *multiple comparisons*. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan yang berganda terhadap data hasil tes FBUT antara setiap kelompok perlakuan genistein, dengan hasil sebagai berikut.





**Tabel 5.9. Uji perbandingan berganda Tukey hasil tes FBUT**

Perbandingan antar Kelompok		Beda rata-rata	Sig.	Keputusan
KP	P1 (50 $\mu$ M)	-1.200	0.839	Tidak berbeda signifikan
	P2 (100 $\mu$ M)	-4.400	0.009	berbeda signifikan
	P3 (200 $\mu$ M)	-4.600	0.006	Berbeda signifikan
	KN	-7.000	0.000	Berbeda signifikan
P1 (50 $\mu$ M)	P2 (100 $\mu$ M)	-3.200	0.082	Tidak berbeda signifikan
	P3 (200 $\mu$ M)	-3.400	0.058	Tidak berbeda signifikan
	KN	-5.800	0.001	Berbeda signifikan
P2 (100 $\mu$ M)	P3 (200 $\mu$ M)	-0.200	1.000	Tidak berbeda signifikan
	KN	-2.600	0.209	Tidak berbeda signifikan
P3 (200 $\mu$ M)	KN	-2.400	0.276	Tidak berbeda signifikan

Keterangan:

Jika nilai signifikansi ( $p$ )  $< \alpha 0.05$  = ada perbedaan yang signifikan

Jika nilai signifikansi ( $p$ )  $> \alpha 0.05$  = tidak ada perbedaan yang signifikan

Kemudian dari hasil uji perbandingan berganda (*Tukey's Test*) pada setiap perlakuan, menunjukkan bahwa antara rata-rata hasil tes FBUT pada kelompok kontrol positif (KP) berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok yang diberi genistein pada dosis 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M dan KN ( $p < 0.05$ ). Hasil tes FBUT pada kelompok kontrol positif (KP) tidak berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok yang diberi genistein pada dosis 50  $\mu$ M ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes FBUT pada kelompok genistein pada dosis 50  $\mu$ M berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok kontrol negatif ( $p < 0.05$ ). Hasil tes FBUT pada kelompok genistein pada dosis 50  $\mu$ M tidak berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok genistein dosis 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, dan kelompok kontrol positif (KP) ( $p > 0.05$ ).





Perbandingan rata-rata hasil tes FBUT pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok kontrol positif ( $p < 0.05$ ). Tetapi hasil tes FBUT pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  tidak berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$ , dosis 50  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol negatif (KN) ( $p > 0.05$ ).

Perbandingan rata-rata hasil tes FBUT pada kelompok kontrol negatif (KN) berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok genistein pada dosis 50  $\mu\text{M}$ , dan kelompok kontrol positif (KP) ( $p < 0.05$ ). Hasil tes FBUT pada kelompok kontrol negatif (KN) tidak berbeda signifikan dengan hasil tes FBUT pada kelompok genistein dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$  ( $p > 0.05$ ).

Berdasarkan plot respon tersebut dapat dibentuk urutan dari efek perlakuan terhadap rata-rata hasil tes FBUT dari urutan yang paling rendah sampai dengan hasil tes FBUT yang paling tinggi, sebagai berikut.

**Tabel 5.10. Urutan rata-rata hasil tes FBUT sebagai efek perlakuan genistein**

No	Perlakuan Dosis Genistein	Rata hasil tes FBUT (mean $\pm$ std.dev.)
1	KN	14.60 $\pm$ 2.97
2	P3 (200 $\mu\text{M}$ )	12.20 $\pm$ 1.30
3	P2 (100 $\mu\text{M}$ )	12.00 $\pm$ 1.87
4	P1 (50 $\mu\text{M}$ )	8.80 $\pm$ 0.84
5	KP	7.60 $\pm$ 1.52

Perlakuan genistein pada dosis 200  $\mu\text{M}$  dapat meningkatkan hasil tes FBUT dengan rata-rata yang paling tinggi (mean=12.2 satuan) daripada genistein pada dosis yang lebih rendah yaitu dosis 100  $\mu\text{M}$  dan 50  $\mu\text{M}$ , sehingga genistein pada dosis 200  $\mu\text{M}$  mampu meningkatkan hasil tes FBUT hingga menjadi normal daripada





hasil tes FBUT pada dosis 100  $\mu\text{M}$ . Perlakuan genistein pada dosis 100  $\mu\text{M}$  mampu meningkatkan hasil tes FBUT hingga menjadi normal daripada hasil tes FBUT pada dosis 50  $\mu\text{M}$ . Perlakuan genistein pada dosis 50  $\mu\text{M}$  dapat lebih meningkatkan hasil tes FBUT daripada kontrol positif, sehingga dosis 50  $\mu\text{M}$  masih lebih baik daripada kontrol positif.

Tanda utama SDE adalah *Tear Film* yang tidak stabil dan merupakan disfungsi unit fungsional lakrimal. Tes FBUT merupakan tes kuantitatif yang paling penting untuk mengukur stabilitas *Tear Film* dan praktis dalam mendiagnosis SDE.

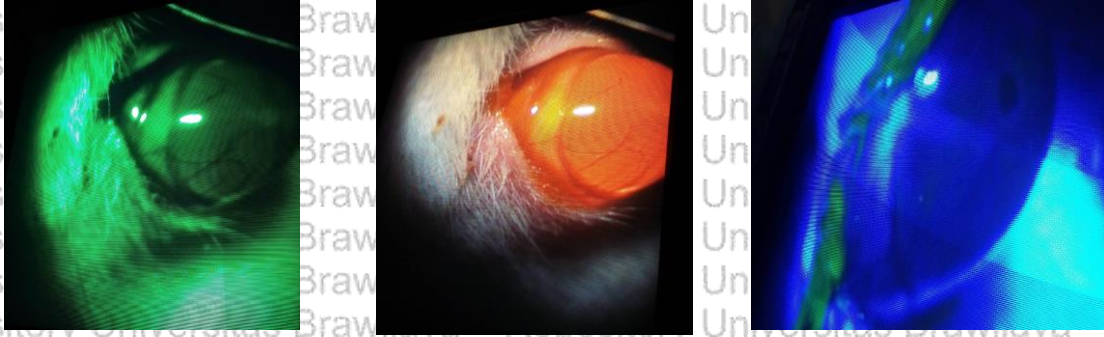
Nilai FBUT kurang dari 5-10 detik menunjukkan airmata tidak stabil dan terdapat pada SDE ringan-sedang. Tes dilakukan tanpa anastesia topikal dan tanpa pemegang kelopak, karena untuk mengurangi *tear break up time*. Mekanisme *tear breakup* setelah berkedip, karena *Tear Film* prekorneal tipis sehingga mengalami evaporasi dan retraksi masuk ke fornik. Selain itu lipid superfisial secara difus melalui lapisan akuos ke permukaan musin, konversi menjadi permukaan hidrofobik, yang diikuti dengan retraksi lapisan akuos dari area yang terkontaminasi menjadi *dry spot*. Lapisan akuos *Tear Film* tebal (6-9mm), dan daya tarik antara musin dan molekul lipid sangat lemah, sehingga terjadi migrasi molekul lipid. Beberapa faktor mempengaruhi *tear breakup time*. Penahan kelopak dan anastesia lokal mengurangi *breakup time*, tidak ada korelasi *breakup time* dengan gender atau usia. *Break up time* berkorelasi terbalik dengan antara lebar fisura palpebra (DEWS, 2007; Perry, 2008; De Paiva, 2008; Ogawa, 2013).

Penelitian ini menggunakan Tes FBUT karena pada pelaksanaannya ketika mendekatkan mata tikus didepan slitlamp tampak jelas awal hilangnya warna fluoresin sehingga peneliti dapat menilai waktunya. Fluoresin digunakan untuk





mengukur lamanya waktu terhadap pecahnya airmata, dan mengamati hilangnya sel epitel kornea lokal tampak sebagai punggata *staining* yang merupakan integritas epitel terganggu. Tes FBUT mempunyai spesifisitas 83% dan sensitivitas 86%.



**Gambar 5.9. Tes Fluoresin Break Up Time.** Tes FBUT pada tikus dengan alat slit lamp dengan sinar filter biru dan hijau. Tampak dengan mengukur lamanya waktu airmata yang pecah (*break up time*).

Menurut De Paiva (2008) diagnosis SDE tergantung dari hasil beberapa tes, yang ideal dilakukan pada saat kunjungan awal. Pada penelitian ini tes diagnostik pada semua sampel dikerjakan tepat setelah 1 bulan paska ovariektomi. Pada kelompok kontrol negatif (normal) hasil pemeriksaan tes Schirmer, TFBUT dan tes Ferning tidak didapatkan tanda SDE.

Hasil analisa statistik penelitian pemeriksaan tes diagnostik SDE pada OVX dan setelah perlakuan genistein tidak semuanya menunjukkan tes Schirmer, tes Ferning dan TFBUT dengan hasil sesuai harapan. Hal ini sesuai dengan banyak literatur, Chen, (2011) menyebutkan bahwa guna mendiagnosis SDE secara absolut pada umumnya dilakukan dua jenis tes atau lebih. Tidak ada tes *single* yang adekuat untuk menetapkan diagnosis SDE (De Paiva, 2008; Chen, (2011)).





## 5.7. Kesimpulan dan Saran

### 5.7.1. Kesimpulan

Dari penelitian tahap 1 dapat disimpulkan bahwa:

1. SDE pada tikus model OVX didapatkan dengan hasil tes diagnostik SDE.
2. Perlakuan genistein dosis 50-200  $\mu\text{M}$  meningkatkan hasil tes Schirmer.
3. Perlakuan genistein dosis 50-200  $\mu\text{M}$  menurunkan hasil tes Ferning.
4. Perlakuan genistein dosis 50-200  $\mu\text{M}$  meningkatkan hasil tes FBUT.

### 5.7.2. Saran

Hasil penelitian tahap 1 telah membuktikan adanya SDE pada tikus model dengan OVX dan setelah perlakuan genistein topikal hasil tes diagnostik SDE menunjukkan adanya perbaikan, sehingga diperlukan penelitian tahap 2 untuk mengetahui pengaruh perlakuan genistein topikal 4x sehari setetes selama 1 minggu, terdiri dari 3 kelompok ( pada masing- masing kelompok diberikan genistein 50  $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , dan 200  $\mu\text{M}$ ) dan 2 kelompok kontrol positif (SDE pada tikus model OVX), dan kelompok kontrol negatif ( tanpa OVX) melalui : i) ekspresi seluler RE $\beta$  sel epitel konjungtiva, ii) ekspresi seluler IL-1 $\beta$  sel epitel konjungtiva, iii) ekspresi seluler NF-kB sel epitel konjungtiva, iiiii) ekspresi seluler MUC5AC sel goblet konjungtiva, iiiii) ekspresi seluler K12,K13 dan p63 sel punca epitel limbal dari semua kelompok.

Hasil penelitian pada tahap 1 diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan sehingga mendapatkan data untuk mengetahui tingkatan SDE.