

PERAN TGF- β 1 TERHADAP EKSPRESI RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -KATENIN DAN α -SMA PADA KULTUR SEL MYOFIBROBLAS ORBITAL SOKET KONTRAKTUR

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Doktor



Oleh

DEBBY SHINTIYA DEWI

NIM. 107070100111003

PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

KEKHUSUSAN BIOMEDIK

PROGRAM PASKA SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

2018

**PERAN TGF- β 1 TERHADAP EKSPRESI RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2,
 β -KATENIN DAN α -SMA PADA KULTUR SEL MYOFIBROBLAS**

ORBITAL SOKET KONTRAKTUR

DISERTASI



Nama Mahasiswa : Debby Shintiya Dewi
NIM : 107070100111003
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Minat : Biomedik

Menyetujui

PROMOTOR

Ketua,

(dr. Hidayat Sujuti, M.Sc.,Ph.D.,Sp.M.)

KO PROMOTOR 1

KO PROMOTOR 2

(Dra. Diana Lyrawati, Apt.,M.Kes.,Ph.D.)(Dr.dr. RR. Tinny Endang Hernowati, SpPK.)



IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI

JUDUL DISERTASI:

PERAN TGF- β 1 TERHADAP EKSPRESI RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -KATENIN DAN α -SMA PADA KULTUR SEL MYOFIBROBLAS ORBITAL SOKET KONTRAKTUR

NAMA : Debby Shintiya Dewi

NIM : 107070100111003

Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Minat Brawijaya : Univ Biomedik

KOMISI PEMBIMBING

Promotor : dr. Hidayat Sujuti, M.Sc.,Ph.D.,SpM.

Ko-Promotor 1 : Dra. Diana Lyrawati, Apt.,M.Kes.,Ph.D.

Ko-Promotor 2 : Dr. dr. RR. Tinny Endang Hernowati, SpPK.

TIM PENGUJI

Pengaji 1 : Prof.dr. M. Aris Widodo, MS.,SpFK.,PhD.

Pengaji 2 : Prof.Dr.dr. Sumarno, DMM.,SpMK.(K).

Pengaji Luar : Prof.dr. Soehardjo, SU, SpM(K)

RINGKASAN

Debby Shintiya Dewi, NIM 107070100111003. Program Pascasarjana. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 23 Juli 2018. Peran TGF- β 1 terhadap Ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -catenin dan α -SMA pada Kultur Sel Myofibroblas Orbital Soket Kontraktur

Orbital soket kontraktur, selanjutnya disebut sebagai soket kontraktur, merupakan masalah yang sering terjadi pada Soket anoftalmia. Pada keadaan ini protesa (mata palsu) tidak dapat terpasang dengan baik, sehingga menimbulkan masalah kosmetik bagi penderita. Soket kontraktur memberikan gambaran klinis hilangnya fornix dengan scar dan granulasi. Soket kontraktur dapat terjadi akibat keradangan kronik atau trauma kimia/api. Pemakaian protesa juga dapat menyebabkan iritasi kronis sehingga menimbulkan respon berupa proses penyembuhan luka kronis.

Penatalaksanaan soket kontraktur sampai saat ini masih menjadi dilema dan tantangan bagi dokter mata. Dilaporkan tidak lebih dari 50% kasus yang membaik dengan operasi. Hal ini dapat dicapai dengan perluasan area menggunakan *flap* dan *graft*. Keberhasilan rekonstruksi soket dicapai bila dapat dibentuk fornix yang dalam, soket yang stabil dan permukaan konjungtiva yang luas, sehingga dapat menahan protesa pada posisi baik secara kosmetik dan mempertahankan fungsi kelopak mata. Penyebab tersering terjadinya soket kontraktur kembali segera setelah operasi rekonstruksi karena jaringan fibrosis tersebut terjadi kembali dengan cepat pada saat proses penyembuhan luka operasi rekonstruksi soket ulang. Saat ini belum didapatkan penanganan soket kontraktur yang efektif dan efisien. Beberapa studi menyebutkan berbagai teknik belum benar-benar dapat mencegah terjadinya soket kontraktur dan berulangnya keadaan ini pada penderita pasca operasi rekonstruksi. Pencegahan ini dapat dimungkinkan apabila telah diketahui penyebab biomolekular terjadinya soket kontraktur dan atau berulangnya keadaan tersebut.

Patogenesis terjadinya soket kontraktur dapat disebabkan oleh banyak faktor. TGF- β 1 sebagai sitokin profibrotik utama merupakan salah satu faktor penyebab dan dapat pula dipengaruhi oleh faktor atau protein yang lain. Pada penelitian ini difokuskan pada TGF- β 1 dan beberapa protein yang berhubungan dan merupakan sinyaling lanjutan dari TGF- β 1 sampai terjadinya fibrosis soket kontraktur. TGF- β adalah sitokin multifungsional yang meregulasi morfogenesis dan diferensiasi jaringan melalui sel proliferasi, diferensiasi, apoptosis dan produksi matrik ekstraselular.

TGF- β memegang peranan terbesar pada setiap fase pada proses penyembuhan luka pada mata dengan meningkatkan sekresi *growth factor* yang terlibat pada migrasi sel, proliferasi, deposisi ECM dan pembentukan myofibroblas. Oleh karenanya TGF- β masih menjadi target kunci yang potensial untuk intervensi pengobatan proses scarring. TGF- β merupakan sitokin profibrotik dan peningkatan kadarnya berperan penting dalam deposisi kolagen dan matrik ekstraseluler, penyembuhan luka dan pembentukan scar pada jaringan soket kontraktur. Sinyal TGF- β 1 melalui jalur Smad-dependen dan Smad-independen. Jalur Smad-dependen (Smad2/3) mengaktifkan perubahan seluler yang diinduksi TGF- β , misalnya sintesa dan sekresi kolagen yang akan meningkatkan pembentukan scar. Jalur sinyaling Smad-independen (melalui mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3 kinase (PI3K) atau Rho/rho-associated kinase) meningkatkan penyembuhan luka. Namun sampai saat ini mekanisme molekuler yang menjadi pencetus dan meregulasinya masih dipelajari lebih jelas. TGF- β 1 berinteraksi dengan jalur sinyaling lain seperti Wnt/ β -catenin dan Rho untuk menginduksi efek biologis. Induksi TGF- β 1 akan mengaktifasi Rho GTPase, GSK3, JNK dan β -catenin. Pada akhirnya sinyaling tersebut akan meningkatkan aktivitas matrik metaloproteinase-2 (MMP-2) dalam pembentukan ECM dan remodeling jaringan ikat, serta meningkatkan kadar α -SMA sebagai protein utama dalam diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas.

Permasalahan dalam penelitian ini adalah Bagaimanakah peran TGF- β 1 terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas orbital soket kontraktur? Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan model invitro yang terbagi dalam 2 tahap. Penelitian tahap 1 bertujuan untuk mengetahui pengaruh TGF- β 1 dan jumlah pasase terhadap ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel pada kultur myofibroblas soket kontraktur. Penelitian tahap 2 bertujuan untuk menganalisa pengaruh TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur. Pemeriksaan ekspresi α -Sma dengan imunohistokimia dan mikroskop konfokal. Pemeriksaan ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA menggunakan ELISA KIT, sedang morfologi sel fibroblas dan atau myofibroblas diperiksa dengan pembesaran 100x dengan mikroskop inverted Olympus IX 71 dan pembesaran 400x dengan CLSM FV1000

Pada penelitian ini didapatkan kesimpulan bahwa peningkatan jumlah subkultur/pasase meningkatkan ekspresi α -SMA dan tidak merubah morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas. Pemberian TGF- β 1 10 ng/mL tidak mampu mempertahankan, bahkan menurunkan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase. Peningkatan dosis TGF- β 1 pada subkultur/pasase 3 menurunkan ekspresi α -SMA dan tidak terdapat perubahan morfologi sel myofibroblas. Morfologi sel myofibroblas tidak dapat berubah kembali menjadi fibroblas. Peningkatan dosis TGF- β 1 meningkatkan ekspresi JNK, sedikit meningkatkan ekspresi RHO GTPase, menurunkan ekspresi GSK3 dan α -SMA, serta tidak berpengaruh pada ekspresi MMP-2 dan β -katenin pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.



Universitas Brawijaya

SUMMARY

Debby Shintiya Dewi, NIM 107070100111003. Post Graduate Programme Faculty of Medicine Brawijaya University, 18 Juli 2018. The Role of TGF- β 1 on RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -Catenin and α -SMA Expression in Myofibroblast Cell Culture Orbital Soket Contracture

Orbital socket contracture, hereafter referred to as socket contracture, is a problem that often occurs in anoftalmia socket. In these circumstances the prosthesis can not be fitted properly, causing a cosmetic problem for patients. Contracture provides a clinical feature as fornix loss with scarring and granulation. Socket contracture may result from chronic inflammation or thermal and chemical burns. The use of prosthesis can also cause chronic irritation causing a response in the form of chronic wound healing process.

Management of socket contracture is still a dilemma and challenge for ophthalmologists. Reported to not more than 50% of cases were improved by surgery. This can be achieved by the expansion of the area using the flap and graft. The successful socket reconstruction is achieved when deep fornix, stable socket and extensive conjunctival surface can be formed, so that the prosthesis cosmetically in good positioned and maintains the function of the eyelids. The most common causes of recurrent socket contractures after reconstructive surgery is the occurrence of fibrosis tissue development during the wound healing process after socket re-reconstruction surgery. Currently, there is no effective and efficient socket contractures management. Some studies suggest that various techniques can not completely prevent the occurrence and recurrence of socket contractures in patients with postoperative reconstruction. Prevention may be possible if we know the biomolecular cause of socket contracture.

The pathogenesis of sockets contracture can be caused by many factors. TGF- β 1 as a major profibrotic cytokine is one of the causal factors and may also be influenced by other factors or proteins. In this study focused on TGF- β 1 and some related proteins and the downstream of TGF- β 1 to the occurrence of socket contracture fibrosis. TGF- β 1 is a multifunctional cytokine that regulates morphogenesis and tissue differentiation through cell proliferation, differentiation, apoptosis and extracellular matrix production.

TGF- β plays an important role in every phase of wound healing process in the eye by increasing the secretion of growth factors involved in cell migration, proliferation, ECM deposition and myofibroblasts formation. Therefore, TGF- β is a key target for potential therapeutic intervention to modulate scarring process. TGF- β is a profibrotic cytokine and its increased level plays an important role in deposition of collagen and extracellular matrix, wound healing and scar formation of socket contractures tissue. TGF- β 1 signal through the Smad-dependent and Smad-independent. Smad-dependent pathways (Smad2/3) activate cellular changes induced by TGF- β , such as the synthesis and secretion of collagen that increase scar formation. Smad-independent signaling pathway (via the mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3-kinase PI3K) or the Rho / Rho-associated kinase) improves wound healing. But now the molecular mechanisms that trigger and regulate more clearly still being studied. TGF- β 1 interacts with other signaling pathways such as Wnt / β -catenin and Rho to induces biological effects. Induction of TGF- β 1 will activate Rho GTPase, GSK3, JNK and β -catenin. This signaling will increase matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the formation of ECM and connective tissue remodelling, as well as increasing the level of α -SMA as the main protein in the differentiation of fibroblast into myofibroblast.

The problem in this study, how is the role of TGF- β 1 on the expression of RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -catenin and α -SMA in the myofibroblast cell culture of orbital socket contracture? This research is an experimental research with invitro model which is divided into 2 Phase. The purpose of the first phase is to determine the effect of TGF- β 1 and number of passages on -SMA expression and morphological changes in the myofibroblast cell culture of orbital socket contracture. The purpose of the second phase is to analyze the effect of various doses of TGF- β 1 on RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -catenin and α -SMA expression in the myofibroblast cell culture of orbital socket

contracture. α -Sma expression examine with immunohistochemistry and confocal microscopy. Examination of the RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, and β -catenin expression using ELISA KIT, while the morphology of fibroblasts or myofibroblasts was examined by 100x magnification with an inverted Olympus IX 71 microscope and 400x magnification with CLSM FV1000.

In this study we can conclude that increasing the number of passages increases the expression of α -SMA and the morphology of myofibroblasts cell does not transform into fibroblasts. Addition of TGF- β 1 10 ng/mL is unable to maintain, even decrease the expression of α -SMA and morphology of fixed cells in the form of myofibroblas with increasing number of passages. Increased dose of TGF- β 1 in passages 3 decreased the expression of α -SMA and no morphological changes in myofibroblast cells. The morphology of myofibroblasts cells can not turn back into fibroblasts. Increased doses of TGF- β 1 increase JNK expression, slightly increase RHO GTPase expression, decrease GSK3 and α -SMA expression, and have no effect on MMP-2 and β -catheneine expression in socket contracture myofibroblast cell culture.



	DAFTAR ISI	
LEMBAR PERSETUJUAN		
IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI.....		
RINGKASAN		
SUMMARY		
DAFTAR ISI		
DAFTAR TABEL		
DAFTAR GAMBAR		
DAFTAR SINGKATAN		
BAB 1 PENDAHULUAN		
1.1 Latar Belakang		1
1.2 Rumusan Masalah		6
1.2.1 Permasalahan Umum		6
1.2.2 Permasalahan Khusus		6
1.3 Tujuan Penelitian		7
1.3.1 Tujuan Umum		7
1.3.2 Tujuan Khusus		7
1.4 Manfaat Penelitian		8
1.4.1 Bagi Perkembangan Patogenesis Orbital Soket Kontraktur		8
1.4.2 Bagi Peneliti		8
1.4.3 Bagi Pasien Orbital Soket Kontraktur		8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA		9
2.1 Soket Anoftalmia		9
2.2 Soket Kontraktur		11
2.2.1 Definisi dan Gambaran Klinis		11

2.2.2 Klasifikasi dan Penatalaksanaan Soket Kontraktur	14
2.3 Penyembuhan Luka (<i>Wound Healing</i>)	16
2.4 Proses <i>Scarring</i>	23
2.4.1 Patogenesis <i>Scarring</i>	25
2.5 <i>Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1)</i>	34
2.6 Rho GTPase	38
2.7 <i>Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)</i>	42
2.8 <i>Jun N-Terminal Kinase (JNK)</i>	43
2.9 Matrik Metaloproteinase-2 (MMP-2)	45
2.10 β -Katenin	50
2.11 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)	51
2.12 Morfologi Sel Fibroblas dan Myofibroblas	52
2.13 Subkultur/passage	54
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	56
3.1 Kerangka konsep	56
3.2 Hipotesis	59
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	60
4.1 Desain Penelitian	60
4.2 Sampel Penelitian	60
4.3 Waktu dan Tempat Penelitian	61
4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	61
4.5 Variabel dan Definisi Operasional	61
4.6 Bahan dan Alat	61
4.7 Prosedur Penelitian	62
4.8 Analisis Data	62
4.9 Etika Penelitian	62

BAB 5 PENELITIAN TAHAP I	63
5.1 Pendahuluan	63
5.1.1 Latar Belakang	63
5.1.2 Rumusan masalah	65
5.1.3 Tujuan Penelitian	65
5.2 Kerangka Konsep Penelitian Tahap 1	66
5.3 Hipotesis Penelitian	66
5.4ji Desain Penelitian	67
5.4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	67
5.4.2 Sampel Penelitian	67
5.4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	67
5.4.4 Variabel Penelitian	68
5.4.5 Definisi Operasional	68
5.4.6 Alat dan Bahan Penelitian	69
5.4.7 Prosedur Penelitian	70
5.4.8 Analisis Data	72
5.4.9 Alur Penelitian Tahap 1	73
5.5 Hasil dan Pembahasan Penelitian Tahap 1	73
5.5.1 Efek jumlah pasage pada ekspresi α -SMA	73
5.5.2 Efek Penambahan TGF- β 1 10 ng/mL pada pasage berbeda terhadap ekspresi α -SMA	75
5.5.3 Morfologi Sel Myofibroblas pada perbedaan pasage dan penambahan TGF- β 1	77
5.5.4 Efek Penambahan TGF- β 1 berbagai dosis pada pasage 3 terhadap ekspresi α -SMA	78

5.6 Kesimpulan dan Saran.....	80
5.6.1 Kesimpulan.....	80
5.6.2 Saran.....	81
BAB 6: PENELITIAN TAHAP 2.....	82
6.1 Pendahuluan.....	82
6.1.1 Latar Belakang.....	82
6.1.2 Rumusan masalah.....	83
6.1.3 Tujuan Penelitian	83
6.2 Kerangka Konsep Penelitian Tahap 2.....	84
6.3 Hipotesis Penelitian	84
6.4 Desain Penelitian	85
6.5 Waktu dan Tempat Penelitian	85
6.6 Sampel Penelitian	85
6.7 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	86
6.8 Variabel Penelitian	86
6.9 Definisi Operasional	87
6.10 Alat dan Bahan Penelitian	88
6.11 Prosedur Penelitian	89
6.12 Analisis Data	97
6.13 Alur Penelitian Tahap 2	98
6.14 Hasil Penelitian dan pembahasan.....	99
6.14.1 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap GSK3.....	99
6.14.2 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap β -Catenin.....	100
6.14.3 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap JNK.....	102
6.14.4 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap MMP2.....	103
6.14.5 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTPase.....	105
6.14.6 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap α SMA.....	106



6.15 Kesimpulan.....	108
BAB 7 PEMBAHASAN UMUM.....	109
BAB 8 KESIMPULAN DAN SARAN.....	113
8.1 Kesimpulan.....	113
8.2 Saran.....	113
DAFTAR PUSTAKA.....	115





	DAFTAR TABEL	
Tabel 2.1 Kadar PGE2 dan TGF- β pada penyembuhan luka normal dan scar	23	halaman
Tabel 5.1 Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase (P) 1,2,3	74	
Table 5.2 Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase (P) 1,2,3 dengan TGF- β 10ng/mL.....	75	

DAFTAR GAMBAR	
Gambar 2.1 Anatomi skematis mata	9
Gambar 2.2 Anatomi mata normal	10
Gambar 2.3 Soket anoftalmia	10
Gambar 2.4 Permukaan soket anoftalmia	10
Gambar 2.5 Anatomi soket anoftalmia	11
Gambar 2.6 Soket kontraktur pada mata kiri	12
Gambar 2.7 Soket kontraktur	13
Gambar 2.8 Derajat soket kontraktur	15
Gambar 2.9 Luka pada kulit, 3 hari setelah injuri	18
Gambar 2.10 Luka pada kulit 5 hari setelah injuri	21
Gambar 2.11 Fase remodeling (fase reepitelisasi dan neovaskularisasi), diperantarai oleh sitokin	22
Gambar 2.12 Fase-fase penyembuhan luka	25
Gambar 2.13 Proses penyembuhan luka dan sitokin yang terlibat	27
Gambar 2.14 Perbedaan antara penyembuhan luka normal dan pembentukan scar yang berlebihan	30
Gambar 2.15 Hasil dari proses penyembuhan luka: regenerasi jaringan atau fibrosis	32
Gambar 2.16 Molekul pada jalur TGF- β	36
Gambar 2.17 Regulasi sinyaling Rho GTPase oleh GEF, GAP dan GDI	40
Gambar 2.18 Mekanisme sinyaling Wnt dapat menginhibisi GSK3, akumulasi β -catenin dan aktifasi transkripsi gen	43
Gambar 2.19 Jalur sinyaling TGF- β 1	45
Gambar 2.20 Sel fibroblas	53
Gambar 2.21 Perubahan fibroblas menjadi myofibroblas, dan sebaliknya	53
Gambar 2.22 Sel myofibroblas	54
Gambar 5.1 Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase kultur sel yang berbeda (P1, P2, P3) tanpa TGF- β 1	74
Gambar 5.2 Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase kultur sel yang berbeda (P1, P2, P3) dengan penambahan TGF- β 1 10ng/ml	75
Gambar 5.3 Efek pasase dan penambahan TGF- β 1	76

Gambar 5.4 Hasil Pengamatan dengan CLSM.....	77
Gambar 5.5... Efek Penambahan TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi α -SMA diteliti pada pasase 3 kultur myofibroblas.....	79
Gambar 6.1 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap GSK3.....	99
Gambar 6.2 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap β -Catenin.....	100
Gambar 6.3 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap JNK.....	102
Gambar 6.4 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap MMP2.....	104
Gambar 6.5 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTPase.....	105
Gambar 6.6 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap α SMA.....	107



DAFTAR SINGKATAN	
ADRP	: Adipose Differentiation-Related Protein
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ang	: Angiopoietins-Protein Growth Factor
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
AP-1	: Activator Protein-1
α -SMA	: Alpha Smooth Muscle Actin
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
COX-2	: Cyclo-Oxygenase-2
CVD	: Cardio Vascular Disease (penyakit kardiovaskular)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DTT	: Dithiothreitol
Dvl	: Disheveled
EC	: Endothelial Cells
ECM	: Extra Cellular Matrix/ Matrik Ekstraselular
EGF	: Epidermal Growth Factor
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition
ERK	: Extracellular Signal-Regulated Kinase
FAK	: Focal Adhesion Kinase
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FPH	: Fissura Palpebra Horizontal
FPV	: Fissura Palpebra Vertikal
FRAT	: Frequently Rearranged During Advanced T-Cell Lymphomas
Fzd	: Frizzled
GAP	: GTPase-Activating Protein

GBP	: GSK3-Binding Protein
GDP	: Guanine Di-Phosphate
GEF	: GTPase Exchange Factors
GSH	: Glutathione
GSK3	: Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	: Guanine Tri-Phosphate
HGF	: Hepatocyte Growth Factors
HRP	: Horseradish Peroxidase
HTF	: Human Tenon Fibroblasts
IGF	: Insulin-Like Growth Factor
IFN-γ	: Interferon-γ
IL-2	: Interleukin-2
JNK	: Jun N-Terminal Kinase
KGF	: Keratinocyte Growth Factor
LAP	: Latency-Associated Protein
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEKK	: MAPK Kinase Kinase
MMP	: Matrik Metallo Proteinase
MMP-2	: Matrik Metalo Proteinase-2
MMP-9	: Matrik-Metallo Proteinase-9
PACG	: Glaukoma Sudut Tertutup Primer
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PCP	: Planar Cell Polarity
PCPE	: Procollagen C-Terminal Proteinase Enhancer
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
PDGF AB	: Platelet-Derived Growth Factor AB
PDGF BB	: Platelet-Derived Growth Factor BB

awijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	PDK1	: Phosphoinositide-Dependent Kinase-1	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	PGE2	: Prostaglandin E2	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	PI3K	: Phosphatidylinositol 3-kinase	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	PKC	: Protein Kinase C	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	PLIN2	: Lipid -Binding Protein Perilipin 2	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	POAG	: Glaukoma Sudut Terbuka Primer	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	RECK	: Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein With Kazal Motif	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	RhoGAP	: Rho Guanine Nucleotide Activating Protein	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	Rho GTPase	: Rho Guanine Tri-Phosphatase	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	RhoGDI	: Rho GDP-Dissociation Inhibitor	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	RhoGEF	: Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	ROCK	: Rho-associated kinase	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	SPARC	: Secreted Protein, Acidic, Rich in Cysteine	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TCF/LEF	: Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-Binding Factor	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TFPI2	: Tissue Factor Pathway Inhibitor-2	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TGF- α	: Transforming Growth Factor- α	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TGF β -1	: Transforming Growth Factor β -1	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TGF β -2	: Transforming Growth Factor β -2	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TGF β -3	: Transforming Growth Factor β -3	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TGF β R1	: Transforming Growth Factor β reseptor-1	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TGF β R2	: Transforming Growth Factor β -2	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	THBS	: Thrombospondin	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TIMP	: Tissue Inhibitor of Metalo Proteinase	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	TNF- α	: Tumour Necrosis Factor-alpha	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	t-PA	: tissue-Plasminogen Activator	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	u-PA	: urokinase-Plasminogen Activator	Universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor	Universitas Brawijaya

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mata merupakan organ yang penting dalam tubuh kita. Baik karena fungsinya sebagai indra penglihatan, maupun karena bentuk dan letaknya pada wajah kita sebagai pusat perhatian penampilan kosmetik seseorang. Kecacatan

bentuk mata akan memberikan kecacatan penampilan seseorang. Salah satu kecacatan bentuk mata terjadi akibat tidak adanya bola mata pada rongga mata.

Hal inilah yang disebut sebagai soket anoftalmia. Pada soket anoftalmia dapat dipasang mata palsu yang disebut protesa agar penampilan mata seseorang tampak seperti normal, meskipun secara fungsi tetap tidak dapat melihat. Namun terkadang pada beberapa orang, mata palsu ini sulit atau tidak dapat terpasang sehingga menimbulkan masalah kosmetik bagi penderita. Keadaan yang sering terjadi pada soket anoftalmia ini disebut dengan orbital soket kontraktur, yang selanjutnya akan disebut sebagai soket kontraktur (Poonyathalang *et al.*, 2005; Mavrikakis *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2007).

Kejadian soket kontraktur menurut Adhikari *et al.*, (2007) 7,7% dari keseluruhan soket anoftalmia. Sebesar 5,9% merupakan soket kontraktur dari soket anoftalmia yang didapat, sedangkan soket kontraktur dari soket anoftalmia kongenital sebesar 1,8% (Adhikari *et al.*, 2007). Studi yang kami lakukan di RS dr. Saiful Anwar Malang pada 1 tahun di 2007 menunjukkan bahwa terdapat 10 kasus (32,25%) soket kontraktur dari 31 kasus soket anoftalmia. Interval terjadinya soket kontraktur terbanyak adalah setelah 5 tahun paska pengambilan mata (Lestari, 2008).

Kontraktur memberikan gambaran klinis berupa hilangnya cekungan rongga mata (fornik) dengan terbentuknya jaringan fibrosis dan granulasi. Soket kontraktur dapat terjadi akibat migrasi implan, infeksi jangka lama, keradangan

kronik, banyak kehilangan jaringan konjungtiva saat trauma ataupun akibat trauma kimia/api. Hal ini dapat juga diperparah oleh adanya pemakaian mata palsu atau protesa, karena pada keadaan ini juga terjadi iritasi kronis akibat gesekan protesa dengan soket, sehingga menimbulkan respon berupa proses penyembuhan luka kronis (Stroncek *et al.*, 2008; Kurtul, 2014). Penatalaksanaan soket kontraktur sampai saat ini masih menjadi dilema dan tantangan bagi dokter mata. Dilaporkan tidak lebih dari 50% kasus yang membaik dengan operasi (Mavrikakis *et al.*, 2006). Hal ini dapat dicapai dengan perluasan area menggunakan graft seperti lemak-kulit (Aquilas *et al.*, 1982; Kurtul, 2014), membran mukosa bibir (Lee *et al.*, 2002; Kurtul, 2014), membran amnion (Dua, 1999; Kurtul, 2014), palatum dan mukosa palatum (Wearne, 2001; Lee *et al.*, 2002; Kurtul, 2014), atau kulit (Kurtul, 2014).

Pada penelitian di RS dr. Saiful Anwar Malang didapatkan hasil operasi rekonstruksi soket dengan pemberian antifibrotik Mitomicin C mencegah rekurensi 50% kasus (*Unpublished data.* Suharyanto, 2012). Keberhasilan rekonstruksi soket dicapai bila protesa pada posisi baik secara kosmetik dan mempertahankan fungsi kelopak mata. Penyebab tersering terjadinya soket kontraktur kembali segera setelah operasi karena diseksi jaringan fibrosis yang kurang baik atau karena terjadi kembali jaringan fibrosis dengan cepat pada saat proses penyembuhan luka operasi rekonstruksi soket ulang. Saat ini belum didapatkan penanganan soket kontraktur yang efektif dan efisien. Beberapa studi menyebutkan berbagai teknik belum benar-benar dapat mencegah terjadinya soket kontraktur dan berulangnya keadaan ini pada penderita pasca operasi rekonstruksi (Wearne, 2001; Lee *et al.*, 2002; Mavrikakis *et al.*, 2006; Kurtul, 2014).

Terbentuknya scars hipertropik (fibrosis/scarring) yang mendominasi jaringan soket kontraktur merupakan bentuk penyimpangan penyembuhan luka

berupa aktivitas fibroblas, pembentukan myofibroblas dan deposisi matrik ekstraselular (*Extra Cellular Matrix / ECM*) yang berlebihan selama periode penyembuhan luka. Penyimpangan proses penyembuhan luka terjadi saat dilakukan operasi anoftalmia (pengambilan bola mata) ataupun akibat rekonstruksi soket yang dilakukan sebelum pemasangan protesa (mata palsu). Hal ini diperparah oleh adanya iritasi kronis akibat gesekan protesa dengan soket (Su et al., 2010).

Penyembuhan luka merupakan proses pemulihan/restorasi jaringan yang luka, pada proses ini terjadi re-epitelisasi pembentukan jaringan granulasi dan remodeling jaringan ikat. Proses penyembuhan luka terdiri dari fase keradangan (inflamasi), proliferasi/perbaikan (repair) dan pengembalian (remodeling). Meskipun terdapat fase-fase penyembuhan luka, namun tidak sepenuhnya terdapat batasan tegas antara satu fase ke fase berikutnya (Vaalamo, 2000; Cordeiro et al., 2000; Hasimoto, 2003; Stroncek et al., 2008; Suojanen, 2009).

Tiga fase yang terjadi yaitu fase pertama migrasi dan proliferasi fibroblas, kemudian fase kedua penumpukan matrik ekstraselular dan pembentukan scar, diakhiri fase ketiga remodeling jaringan. Pada fase pertama terjadi peningkatan permeabilitas vaskular yang menyebabkan penumpukan protein plasma misalnya fibronektin dan fibrinogen, membentuk matrik sementara untuk pertumbuhan fibroblas. *Growth Factor* (misalnya *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Transforming Growth Factor* β (TGF- β)) dan sitokin (misalnya *Interleukin-1*(IL-1) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF)) mengatur migrasi dan proliferasi fibroblas. Fase kedua terjadi fase perbaikan, jumlah sel endotel dan fibroblas yang berproliferasi menurun, deposit jaringan lebih banyak digantikan dengan kolagen dan komponen matrik ekstraselular. Sintesa matrik ekstraselular distimulasi oleh *Growth Factor* dan sitokin yang disekresikan oleh fibroblas dan leukosit. Pada

akhir fase ini kerangka jaringan granulasi diubah menjadi *scar* yang terdiri dari fibroblas dan kolagen. Kemudian dilanjutkan dengan fase ketiga yaitu remodeling jaringan, pada fase ini terjadi penggantian jaringan granulasi dengan *scar* yang pada akhirnya melibatkan perubahan pada komposisi matrik ekstraselular (Vaalamo, 2000; Manuskiatti *et al.*, 2002; Monaco *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). TGF- β memegang peranan terbesar pada setiap fase proses penyembuhan luka mata dengan meningkatkan sekresi *growth factor* yang terlibat pada migrasi sel, proliferasi, deposisi ECM dan pembentukan myofibroblas. Oleh karenanya TGF- β masih menjadi target kunci yang potensial untuk intervensi pengobatan proses *scarring*. Selain itu akan lebih baik bila dikombinasi dengan agen lain yang dapat menghambat aspek yang berbeda pada proses *scarring*. Agen ini dapat berupa anti keradangan yang dapat mencegah aktivitas sitokin dan *growth factor* keradangan atau mencegah migrasi dan proliferasi sel (Ellis *et al.*, 2009).

Sinyaling TGF- β 1 melalui jalur Smad-dependen dan Smad-independen. Jalur Smad-dependen (Smad2/3) mengaktifkan perubahan seluler yang diinduksi TGF- β , misalnya sintesa dan sekresi kolagen yang akan meningkatkan pembentukan *scar*. Jalur sinyaling Smad-independen (melalui Mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3 kinase PI3K) atau Rho/rho-associated kinase) meningkatkan penyembuhan luka. Oleh karena itu, penghambatan TGF- β dapat mengurangi terjadinya *scarring* tetapi juga menyebabkan terlambatnya proses penyembuhan luka (Yamanaka *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2009; Schachtrup *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

TGF- β 1 berinteraksi dengan jalur sinyaling selanjutnya seperti Wnt/ β -katenin dan Rho untuk menginduksi efek biologis yang lain. Hal ini memberikan dugaan bahwa jalur Wnt/ β -katenin dan Rho memediasi jalur dibawahnya dengan

dirangsang oleh TGF- β 1. Hubungan antara β -katenin dan Rho GTPase dapat menyebabkan migrasi dan diferensiasi yang diinduksi oleh TGF- β 1. Kompleks degradasi β -katenin terdiri atas axin, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) dan adenomatous polyposis coli (APC) (Shao *et al.*, 2011). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) berpengaruh pada translokasi inti sel dan berperan pula dalam meregulasi sinyaling TGF- β 1. Jun N-Terminal Kinase (JNK) termasuk komponen jalur MAPK. TGF- β 1 dapat menginduksi proses yang berbeda dan terjadi respon yang tumpang tindih pada organ yang berbeda (Pohlers *et al.*, 2009).

Saat ini penelitian pada orbital soket kontraktur masih sangat jarang dan patogenesis soket kontraktur masih belum jelas. Penelitian tentang fibrosis pada mata banyak dilakukan pada jaringan lain misalnya trabekular meshwork, konjungtiva dan kornea. Penelitian pada soket kontraktur diantaranya oleh Tawfik *et. al.* (2016) disebutkan myofibroblas berperan penting dalam memodulasi penyembuhan luka, remodeling jaringan dan deformasi organ dan saat ini α -SMA merupakan marker myofibroblas yang paling dapat dipercaya. Menurut Kurtul (2014) disebutkan TGF- β 1 merupakan sitokin profibrotik utama dan peningkatan kadarnya berperan penting dalam deposisi kolagen dan matrik ekstraseluler, penyembuhan luka dan pembentukan scar pada jaringan soket kontraktur.

Pada studi 1 kasus oleh Dewi (2012) didapatkan soket kontraktur tidak terjadi kembali setelah 7 kali operasi dalam setahun dengan pemberian mitomycin C 0,04% intra operasi dan paska operasi sebagai antifibrotik. Saat ini penanganan soket kontraktur secara klinis dan operasi sudah sangat berkembang, termasuk pemakaian beberapa obat antifibrotik, prosedur *flap* dan *graft* untuk mencegah berulangnya kasus ini. Namun pengetahuan tentang patogenesa dan penyebab biomolekular Soket kontraktur akan lebih bermakna

dalam memahami penyakit lebih mendasar. Oleh karenanya perlu digali lebih dalam dan terperinci patomekanisme soket kontraktur dalam upaya mencegah berulangnya kasus ini dengan diketahui penyebab biomolekular terjadinya Soket kontraktur atau berulangnya keadaan tersebut. Soket kontraktur dapat disebabkan oleh banyak faktor. TGF- β 1 sebagai sitokin profibrotik utama merupakan salah satu faktor penyebab dan dapat pula dipengaruhi oleh faktor atau protein yang lain. Pada penelitian ini diberikan dosis TGF- β 1 10 ng/ml untuk mengantikan lingkungan fibrotik yang ada pada jaringan, sedang pada kultur penelitian ini dianggap tidak terdapat lingkungan fibrotik yang menyebabkan terjadinya fibrosis soket kontraktur tersebut. Kondisi tersebut mendorong penulis untuk mengeksplorasi peran TGF- β 1 terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas orbital soket kontraktur.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Permasalahan Umum

Bagaimanakah peran TGF- β 1 terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas orbital soket kontraktur?

1.2.2 Permasalahan Khusus

1. Bagaimanakah pengaruh peningkatan jumlah pasase terhadap ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas?
2. Bagaimanakah pengaruh pemberian TGF- β 1 10 ng/mL dalam mempertahankan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase?

3. Bagaimanakah pengaruh peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 terhadap peningkatan ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel fibroblas menjadi myofibroblas?

4. Bagaimanakah pengaruh TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas orbital soket kontraktur?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui peran TGF- β 1 terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas orbital soket kontraktur.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh peningkatan jumlah pasase terhadap ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas.
2. Mengetahui pengaruh pemberian TGF- β 1 10 ng/mL dalam mempertahankan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase.
3. Mengetahui pengaruh peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 terhadap peningkatan ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel fibroblas menjadi myofibroblas.
4. Menganalisa pengaruh TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Perkembangan Keilmuan Orbital Soket Kontraktur

Dasar keilmuan baru bidang biomolekuler orbital soket kontraktur, sehingga dapat mencegah terjadinya soket kontraktur dan rekurensinya. Hal ini akan mengurangi kegagalan operasi rekonstruksi soket kontraktur yang sering harus dilakukan berulang-ulang agar protesa dapat terpasang, sehingga penampilan kosmetis mata tampak normal.

1.4.2 Bagi Peneliti

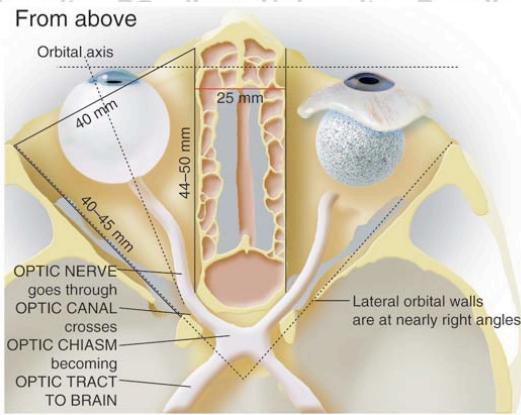
Pengembangan dan aplikasi keilmuan biomolekul yang ditempuh untuk memahami penyebab, patogenesis dan kemanfaatan aplikasi klinis di lapangan dalam pencegahan dan penatalaksanaan orbital soket kontraktur.

1.4.3 Bagi Pasien Orbital Soket Kontraktur

Diharapkan hasil studi ini dapat mencegah terjadinya orbital soket kontraktur sehingga meminimalkan operasi rekonstruksi soket orbita, biaya terapi dan dapat memberikan kemungkinan kekambuhan yang lebih kecil, sehingga protesa/mata palsu dapat terpasang dengan baik dan penampilan kosmetis mata penderita tampak normal walaupun sudah tidak melihat lagi.

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1as Soket Anoftalmia**

Soket anoftalmia lebih sering disebut sebagai anoftalmos atau anoftalmia yang didefinisikan secara klinis sebagai tidak adanya bola mata di dalam rongga orbita (Gambar 2.1). Prevalensi anoftalmia sebesar 0,3 per 100.000 kelahiran (Adhikari *et al.*, 2007).

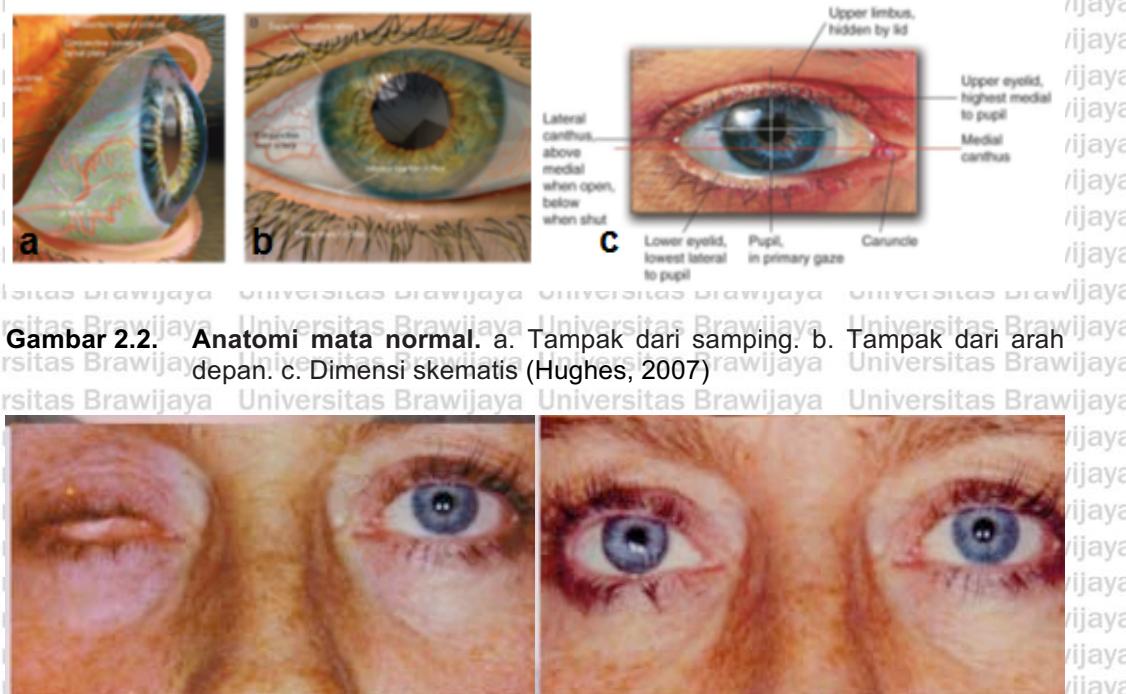


Gambar 2.1. Anatomi skematis mata. Normal (mata kiri). Soket anoftalmia dengan implant dan protesa (mata kanan) (Hughes, 2007)

Hubungan antara mata normal dengan orbita sangat penting dipahami

(Gambar 2.2). Anatomi normal ini sangat penting karena penampilan mata anoftalmia harus semirip mungkin dengan mata sebelahnya setelah pemasangan protesa (Gambar 2.3). Pembukaan antara kedua kelopak mata disebut sebagai fisura palpebra (Gambar 2.2c). Pembukaan kelopak mata dilakukan oleh otot Levator palpebra superior dan Muller's (Hughes, 2007).

Pemahaman tentang mekanik dan anatomi mata normal, soket anoftalmia dan Soket kontraktur serta mengidentifikasi tujuan penanganan yang dapat dicapai sangat penting bagi dokter mata dalam membuat protesa (Gambar 2.4) (Hughes, 2007; Webb, 2010).



Gambar 2.2. Anatomi mata normal. a. Tampak dari samping. b. Tampak dari depan. c. Dimensi skematis (Hughes, 2007)

Pada Soket anoftalmia sudah tidak didapatkan bola mata, sehingga

didalam ruang orbita tinggal didapatkan jaringan orbita yang tertutupi oleh kapsul

tenon dan konjungtiva serta kelopak mata. Permukaan soket ini dipertahankan

tetap licin oleh permukaan konjungtiva agar pada saat pemasangan protesa tidak

menimbulkan kelainan anatomis dan posisi (Gambar 2.4) (Roen, 1995).



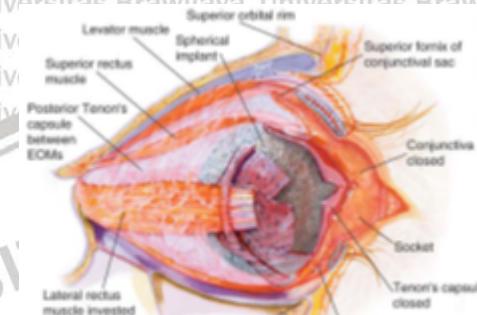
Gambar 2.4. Permukaan soket anoftalmia. Permukaan dipertahankan tetap licin oleh konjungtiva (Hughes, 2007)

Konjungtiva adalah bagian terpenting dari permukaan mata yang

merupakan membran mukosa. Lapisan di bawah konjungtiva disebut kapsul

Tenon yang merupakan struktur membran yang membungkus otot-otot

ekstraokuli, bola mata dan saraf optikus membentuk *muscle cone*. Perubahan anatomi pada soket anoftalmia dapat mengubah estetik dan pergerakan otot ekstra okuli akibat memendeknya otot tersebut meskipun volumenya masih tetap. Hal ini menyebabkan terbatasnya fungsi pergerakan otot tersebut, sehingga protesa juga tidak dapat bergerak seperti bola mata normal (Gambar 2.5). (Detorakis *et al.*, 2003; Hughes, 2007; Keefe *et al.*, 2008).



Gambar 2.5. Anatomi soket anoftalmia. Tampak posisi otot penggerak bola mata, konjungtiva dan kapsul tenon (Hughes, 2007)

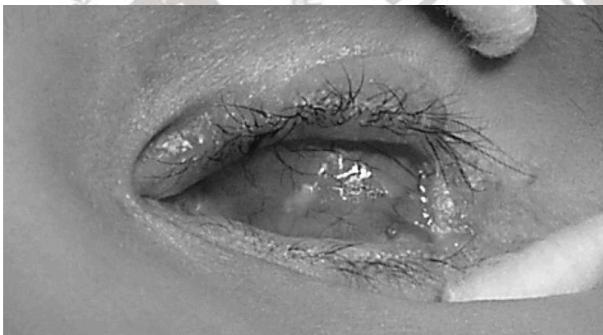
Soket anoftalmia dapat berupa kelainan kongenital maupun yang didapat (acquired). Soket anoftalmia yang didapat adalah akibat dari operasi pengambilan bola mata oleh berbagai sebab. Operasi ini dapat berupa eviserasi, enukleasi dan eksenterasi (Jones, 2001; Tyers *et al.*, 2001; Nunery *et al.*, 2003; Hughes, 2007; Migliori, 2008).

2.2 Soket Kontraktur

2.2.1 Definisi dan Gambaran Klinis

Soket kontraktur merupakan keadaan mengkerutnya atau berkurangnya volume soket, sehingga menyebabkan sulitnya atau tidak dapat terpasangnya protesa pada soket dan menimbulkan masalah kosmetik bagi penderita. Kontraktur dapat terjadi pada fornik superior, inferior atau seluruh volume soket yang memberikan gambaran klinis berupa hilangnya daerah permukaan konjungtiva, jaringan ikat (*scarring*), atropi lemak orbita dan kontraktur atau

pendangkalan fornix (Gambar 2.6) (Garber *et al.*, 1996; Poonyathalang *et al.*, 2005; Mavrikakis *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2007). Studi yang kami lakukan di RS Saiful Anwar Malang pada 1 Januari sampai dengan 31 Desember 2007 menunjukkan bahwa terdapat 10 kasus (32,25%) Soket kontraktur dari 31 kasus Soket anoftalmia. Pada penelitian ini juga didapatkan Soket kontraktur (SK) mengenai 6 (60%) penderita perempuan, rerata usia $32,6 \pm 10,18$ tahun, dengan rentang usia 16 sampai 46 tahun dan paling banyak mengenai usia 26 sampai 40 tahun (50%). Interval terjadinya Soket kontraktur terbanyak adalah setelah 5 tahun pasca pengambilan mata, yaitu pada 6 (60%) penderita, 2 (20%) penderita terjadi dalam interval 1-5 tahun dan 2 (20%) penderita lainnya terjadi kurang dari 1 tahun (Lestari, 2008).

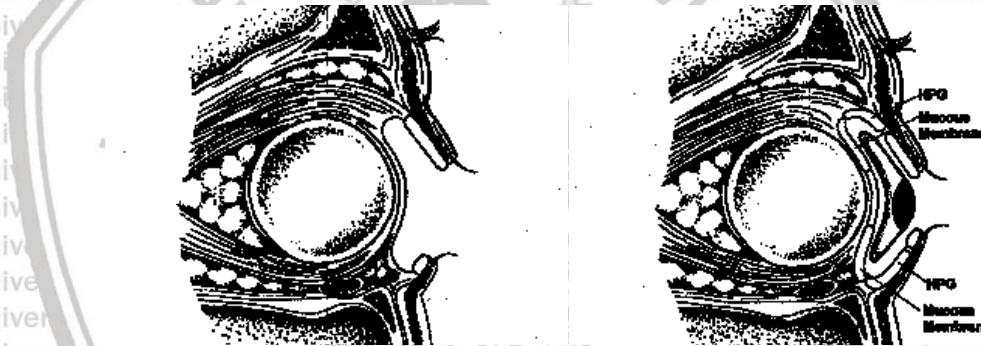


Gambar 2.6. Soket kontraktur pada mata kiri. Tampak sempitnya fisura atau cekungan kelopak mata baik secara vertikal (FPV) maupun horizontal (FPH) dan pendangkalan fornix (Poonyathalang *et al.*, 2005)

Patogenesis Soket kontraktur belum dapat dipahami secara menyeluruh.

Faktor predisposisi Soket kontraktur diantaranya adalah trauma yang berat sampai terjadi enukleasi, termasuk trauma kimia atau luka bakar, penyembuhan luka yang kurang baik, yang berhubungan dengan vaskularisasi yang kurang baik, infeksi, penyakit sikatrik konjungtiva, trauma pasca enukleasi, misalnya radioterapi, tidak digunakan atau posisi yang kurang tepat pada penggunaan konformer dan protesa, serta tidak terdapat implan orbita. Faktor utama yang berpengaruh pada patogenesis Soket kontraktur adalah inflamasi dan fibrosis

yang menyebabkan pemendekan konjungtiva (*shortening of the conjunctiva*) (Jones, 2001; Bajaj, 2006; Migliori, 2008; Zorab et al., 2010). Pada Soket kontraktur terjadi antara lain kekurangan jaringan konjungtiva, sempitnya fisura atau cekungan kelopak mata baik secara vertikal (FPV) maupun horizontal (FPH), pendangkalan fornix, atropi jaringan kelopak mata dan lemak orbita (Gambar 2.7). Terkadang terdapat massa keras di dalam soket orbita, massa yang teraba keras ini merupakan jaringan ikat sikatrik (*fibrous cicatrix/scar*). Dapat juga terdapat simblefaron, konjungtivitis infeksi, keradangan konjungtiva yang lain atau jaringan ikat (*scarring*) konjungtiva. Pada Soket kontraktur yang berat kadang memberikan gambaran klinis apertura atau pembukaan palpebra yang sangat sempit (Lee et al., 2002).



Gambar 2.7. Soket kontraktur. Pendangkalan pada fornix superior dan inferior (Lee et al., 2002)

Rentang waktu antara terjadinya kontraktur atau pemendekan soket dengan dilakukannya operasi sebelumnya dapat bervariasi antara 2 bulan sampai 48 tahun dengan median 7,5 bulan. Sebanyak 2 per 3 bagiannya pernah mengalami operasi soket sebelumnya sebanyak 2 kali (Poonyathalang et al., 2005).

Menurut studi yang dilakukan Kumar et al., (2006) tentang komparasi penanganan Soket kontraktur dengan graf membran amnion dengan membran mukosa, rentang waktu rata-rata terjadinya Soket kontraktur antara 8-10 tahun (Kumar et al., 2006).

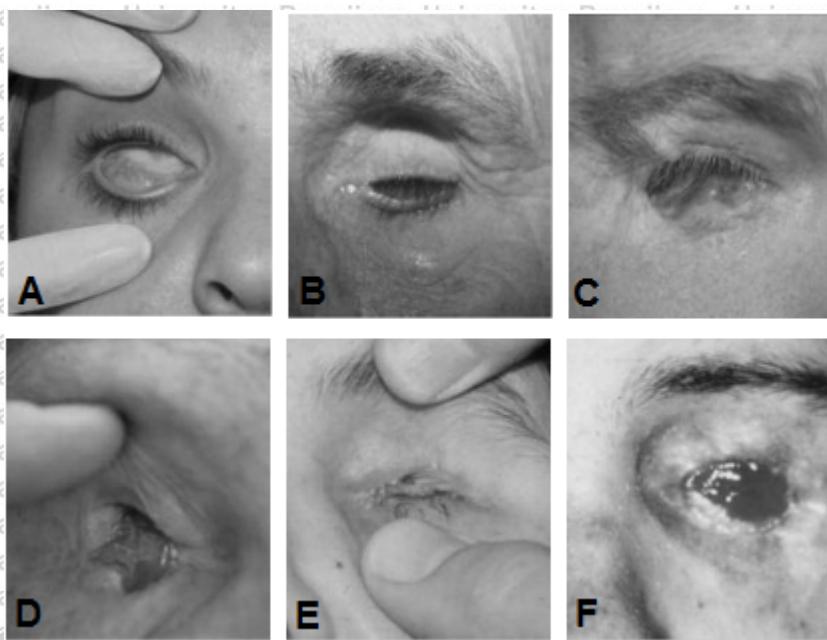
Soket kontraktur dapat disebabkan banyak hal, antara lain trauma berat yang menyebabkan banyaknya jaringan konjungtiva yang hilang, infeksi yang parah, trauma kimia, atau prosedur operasi anoftalmia yang kurang tepat sehingga mengubah anatomi, fisiologi, hemodinamik, kosmetik serta fungsi dari orbita, dan radioterapi (Jones, 2001; Migliori, 2008; Zorab *et al.*, 2010; Kurtul, 2014).

2.2.2 Klasifikasi dan Penatalaksanaan Soket Kontraktur

Pengklasifikasian Soket kontraktur penting dilakukan untuk menentukan teknik operasi rekonstruksi yang sesuai. Pengkategorian yang tepat diperlukan terhadap kondisi yang ada sehingga dapat memberikan gambaran yang lengkap tentang pemilihan jenis koreksi baik secara prostetik dan operasi (Webb, 2010).

Soket kontraktur diklasifikasikan sesuai derajat keparahannya sebagai berikut:

- **Derajat 0:** Soket dengan konjungtiva yang sehat, fornix dalam dan terbentuk dengan baik (Gambar 2.8 A)
- **Derajat 1:** Soket dengan karakteristik fornix inferior yang dangkal atau datar (Gambar 2.8 B)
- **Derajat 2:** Soket dengan karakteristik hilangnya fornix superior dan inferior (Gambar 2.8 C)
- **Derajat 3:** Soket dengan karakteristik hilangnya fornix superior, inferior, medial dan lateral (Gambar 2.8 D)
- **Derajat 4:** Soket dengan karakteristik hilangnya seluruh fornix dan berkurangnya pembukaan kelopak mata baik horizontal maupun vertikal (Gambar 2.8 E)
- **Derajat 5:** Pada beberapa kasus terjadi rekurrensi kontraksi pada soket setelah rekonstruksi berulang (Gambar 2.8 F) (Webb, 2010).



Gambar 2.8. Derajat soket kontraktur. Derajat 0 (A), Derajat 1 (B), Derajat 2 (C), Derajat 3 (D), Derajat 4 (E), Derajat 5 (F) (Webb, 2010)

Karakteristik derajat ringan adalah didapatkan pendangkalan pada 1 atau

2 fornik dan biasanya protesa masih dapat terpasang. Semakin besar derajat

Soket kontraktur maka akan terjadi pendangkalan fornik yang lebih luas dan

berat. Pada derajat 3 dan 4 terdapat gambaran yang sama yaitu hilangnya fornik,

tetapi berbeda pada hilangnya apertura palpebra pada derajat yang lebih berat.

Pada derajat yang paling berat yakni derajat 5 tidak terdapat perbedaan

gambaran apertura, tetapi hanya dibedakan dari adanya rekurrensi kontraktur

yang terjadi setelah dilakukan operasi rekonstruksi yang tidak berhasil dalam 1

tahun terakhir. Hal ini penting dipertimbangkan karena dibutuhkan rentang waktu

spesifik sebelum dilakukannya rekonstruksi yang berikutnya agar tidak terjadi

kegagalan berikutnya yaitu sekitar 1 tahun (Kumar *et al.*, 2006; Webb, 2010).

Soket kontraktur yang terbanyak adalah derajat 4 dengan gambaran

pengeutan konjungtiva berat dan bahkan sudah tidak ada jaringan konjungtiva,

hilangnya fornik dan kedua kantus tampak membulat (Adhikari *et al.*, 2007).

Beberapa *Growth factor* berperan pada setiap fase proses penyembuhan luka yang dapat menyebabkan terbentuknya jaringan scar yang bersifat kontraktif sehingga akan mengganggu bentuk anatomis setelah proses penyembuhan luka (Ellis *et al.*, 2009). Penatalaksanaan Soket kontraktur sampai saat ini masih menjadi dilema dan tantangan bagi dokter mata. Dilaporkan tidak lebih dari 50% kasus yang membaik dengan operasi (Mavrikakis *et al.*, 2006). Hal ini dapat dicapai dengan perluasan area menggunakan graft seperti lemak dermal (Aquila *et al.*, 1982; Kurtul, 2014), membran mukosa bibir (Lee *et al.*, 2002; Kurtul, 2014), membran amnion (Dua, 1999; Kurtul, 2014), palatum dan mukosa palatum (Wearne, 2001; Lee *et al.*, 2002; Kurtul, 2014), atau kulit (Kurtul, 2014). Keberhasilan rekonstruksi soket dicapai bila dapat dibentuk fornik yang dalam, soket yang stabil dan permukaan konjungtiva yang luas, sehingga mencegah terjadinya kontraksi fornik dan jaringan Scar serta dapat menahan protesa yang posisinya baik secara kosmetik dan mempertahankan fungsi kelopak mata. Penyebab tersering terjadinya soket kontraktur kembali segera setelah operasi karena diseksi jaringan fibrosis yang kurang baik (Mavrikakis *et al.*, 2006; Kurtul, 2014).

Saat ini belum didapatkan penanganan soket kontraktur yang efektif dan efisien. Beberapa studi menyebutkan berbagai teknik belum benar-benar dapat mencegah terjadinya Soket kontraktur dan berulangnya keadaan ini pada penderita pasca operasi rekonstruksi (Kurtul, 2014).

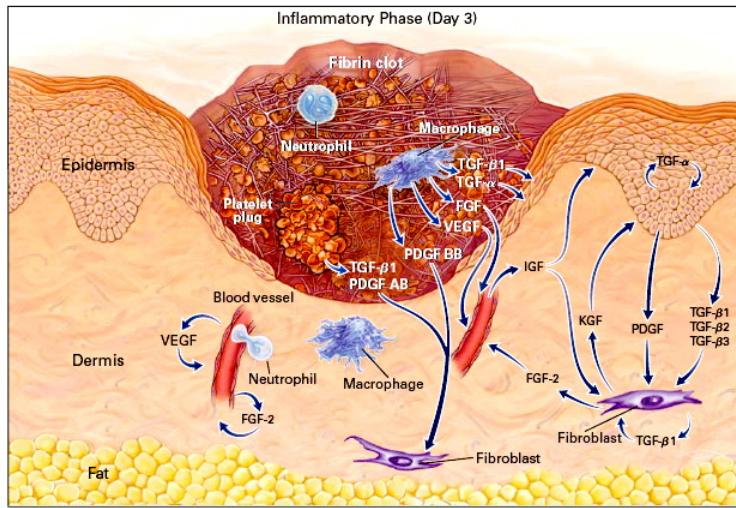
2.3 Penyembuhan Luka (*Wound Healing*)

Proses penyembuhan luka berbeda pada setiap jenis jaringan, meskipun sangat mirip. Luka diklasifikasikan menjadi luka kronik dan akut. Pada luka akut akan terjadi proses interaktif yang kompleks dan melibatkan berbagai jenis sel agar tercapai penyembuhan luka. Sebaliknya pada luka kronis, proses perbaikan

yang terjadi tidak memberikan hasil anatomis yang fungsional (Monaco *et al.*, 2003; Mallefet *et al.*, 2008). Proses penyembuhan terdiri dari 3 fase yaitu fase keradangan, proliferasi dan remodeling. Fase keradangan sebagai fase awal, dimulai sejak terjadinya luka. Pada saat tersebut terjadi aktivasi kaskade koagulasi menyebabkan pelepasan sitokin yang akan menstimulasi kemotaksis neutrofil dan makrofag kearah luka untuk mengawali *debridement* (pembersihan) luka. Proses ini berlangsung selama 2-3 hari dan kemudian dilanjutkan dengan fase proliferasi yang ditandai dengan adanya fibroblas yang berlebihan dan akumulasi matrik ekstraseluler. Fase proliferasi berlangsung selama 3-6 minggu. Kemudian diikuti oleh fase remodeling atau fase matur yang memakan waktu 6-9 bulan. akumulasi matrik ekstraseluler yang berlebihan selama fase ini akan didegradasi dan kolagen tipe III yang imatur pada awal luka akan dimodifikasi menjadi kolagen tipe I yang matur. Penyembuhan luka yang baik melibatkan berbagai faktor yang lebih kompleks (Stroncek *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2010; Gauglitz *et al.*, 2011).

Komplikasi yang dapat terjadi pada proses penyembuhan luka diantaranya dehisensi atau ulserasi luka akibat kurangnya granulasi jaringan atau deposisi dan remodeling kolagen. Dapat pula terjadi perbaikan yang berlebihan akibat jaringan granulasi yang berlebihan sehingga tepinya menonjol dan menghambat epitelisasi. Akumulasi kolagen yang berlebihan menimbulkan scar hipertropi. Komplikasi lainnya adalah terjadinya kontraktur. Meskipun kontraksi luka merupakan bagian normal penyembuhan, namun jika terjadi berlebihan akan terjadi kontraktur dan menyebabkan deformitas atau keterbatasan pergerakan organ (Su *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

Growth factors yang diperlukan untuk migrasi sel kearah luka yaitu TGF β 1, TGF β 2, dan TGF β 3 (*transforming growth factor β -1,2,3*), TGF α (*transforming*



Gambar 2.9. Luka pada kulit, 3 hari setelah injuri. Growth factors yang diperlukan untuk migrasi sel kearah luka yaitu TGF β 1, TGF β 2, dan TGF β 3, TGf α , FGF, VEGF, PDGF, PDGF AB dan PDGF BB, IGF dan KGF (Singer et al., 1999)

Growth factor mayor dalam regenerasi dan penyebuhan luka diantaranya

epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- β (TGF- β), Angiopoietins-protein growth factor (Ang) (Yun et al., 2010).

Growth factors adalah protein soluble yang terlibat secara aktif pada banyak proses termasuk pada perkembangan mata dan penyembuhan luka.

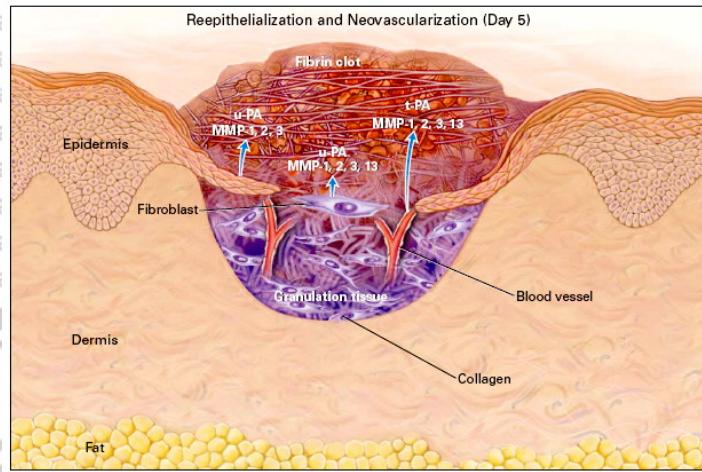
Growth factors diproduksi oleh berbagai jenis sel (Tabel 2.1) dan dapat aktif melalui mekanisme jalur autocrine (berefek pada sel yang sama), juxtacrine (berefek pada sel yang berdekatan dengan kontak langsung, misal pada sel epitel) dan paracrine (sel yang berdekatan). Growth factors digolongkan menjadi

6 yaitu *transforming growth factors* (TGFs), *platelet derived growth factors* (PDGFs), *epidermal growth factors* (EGFs), *fibroblasts growth factors* (FGFs), *insulin-like growth factors* (IGFs) dan *hepatocyte growth factors* (HGFs). TGF disebut *growth factor* yang paling penting karena selain berperan pada transisi myofibroblas dari fibroblas, juga bertanggungjawab terhadap peningkatan deposisi kolagen dan fibronektin oleh berbagai jenis sel. Telah diidentifikasi 5 isoform TGF, tetapi hanya TGF 1,2 dan 3 yang didapatkan pada manusia. Kadar TGF yang rendah meningkatkan produksi PDGF oleh sel, PDGF akan merangsang proliferasi dan migrasi sel menyebabkan pertumbuhan sel. Sedangkan *Tumour necrosis factor-alpha* (TNF- α) dipercaya dapat menghambat migrasi yang diinduksi oleh PDGF (Ellis et al., 2009). Fase proliferasi yang ditandai dengan adanya fibroblas yang berlebihan dan akumulasi matriks ekstraselular. Fase proliferasi berlangsung selama 3-6 minggu. Fibroblas dan vascular endothelial cells (EC) mulai berproliferasi membentuk jaringan granulasi yang merupakan tanda penyembuhan dengan gambaran permukaan luka merah muda, lunak dan bergranular. Jaringan granulasi terbentuk dibawah epitel dan terdiri dari sel keradangan, fibroblas dan pembuluh darah baru yang terbentuk. Secara histologist terdapat proliferasi fibroblas dengan sejumlah pembuluh darah baru pada matriks longgar. Daerah interstitial tampak edem karena pembuluh darah baru yang bocor agar supaya dapat dilewati protein dan sel darah merah (Singer et al., 1999; Monaco et al., 2003; Yun et al., 2010; Su et al., 2010).

Pada saat fase proliferasi, sel mirip fibroblas (*fibroblast-like cells*) dan sel endotel menjadi aktif dan bermigrasi dari jaringan sekitar luka dan pembuluh darah kecil terdekat ke daerah luka. Matriks sementara menjadi cadangan untuk berbagai sitokin, yang memberikan signal langsung ke sel melalui reseptorn integrin. Sedangkan kolagen dan fibronektinnya membentuk kerangka (*scaffold*)

yang akan mengarahkan sel-sel yang bermigrasi. Saat bermigrasi, fibroblas menggunakan integrin untuk menempel pada matrik sementara berupa fibronektin dan fibrinogen. Aktivasi sel mesensimal merupakan langkah awal terbentuknya jaringan granulasi yang terjadi sekitar 3 hari setelah trauma. Aktivasi dan kemotaksisnya diperantarai terutama oleh sitokin diantaranya PDGF dan TGF- β , yang dilepaskan oleh α -granule platelet dan diproduksi oleh makrofag yang telah aktif. Setelah migrasi ke daerah luka, fibroblas bersama makrofag mulai memproduksi protein untuk ECM termasuk glikosaminoglikan, proteoglikan dan protein lain misalnya SPARC, tenasin dan trombospondin. Pembuluh darah baru yang terbentuk berfungsi untuk memberikan pasokan nutrisi dan oksigen. VEGF bersama bFGF dapat meningkatkan vaskularisasi. Sintesa kolagen oleh fibroblas dimulai sejak hari pertama terjadinya luka pada lapisan dermis yang dalam, kemungkinan diinduksi oleh TGF- β yang banyak diekspresikan pada luka. TNF- α dan IL-1 sebagai produksi Makrofag memiliki efek yang berlawanan dan menurunkan produksi kolagen pada fibroblas jaringan granulasi eksperimental. Menariknya, konsentrasi rendah PDGF-AB meningkatkan regulasi sintesa kolagen, sedangkan konsentrasi tinggi akan menurunkan regulasinya. Selama hari pertama setelah terjadinya luka, kolagen tipe III merupakan kolagen fibrilar yang terutama diproduksi dan kemudian berangsur-angsur akan digantikan oleh kolagen tipe I. Transformasi fibroblas jaringan granulasi menjadi myofibroblas menyebabkan kontraksi luka sehingga akan terjadi pengurangan atau penyempitan daerah luka. Hal ini mungkin dimediasi oleh TGF- β yang tampak meningkatkan kontraksi gel kolagen oleh fibroblas (Vaalamo, 2000; Monaco *et al.*, 2003; Wynn, 2007).

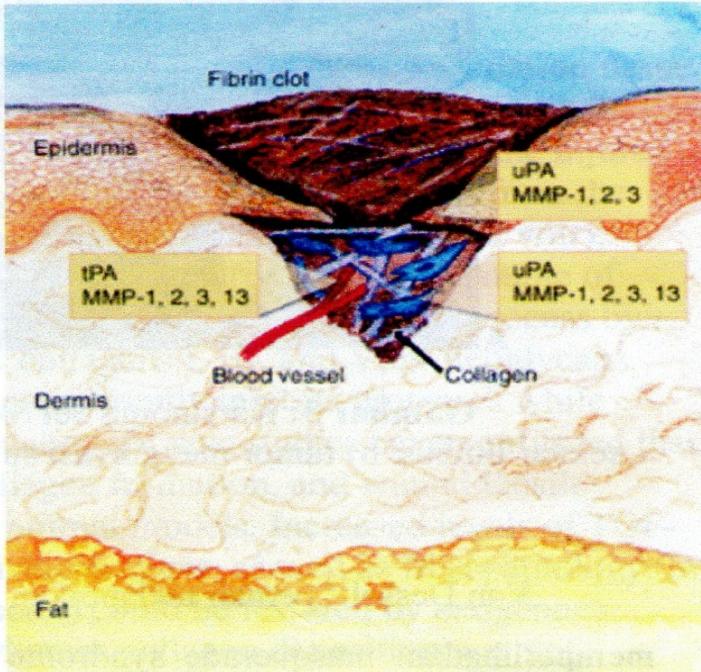
Pada Luka kulit hari 5 setelah injuri akan tampak pembuluh darah mengarah ke fibrin/ bekuan darah dan sel epidermal menutup luka. Terdapat proteinase yang penting untuk pergerakan sel, antara lain: u-PA (*urokinase-jenis*



Gambar 2.10. Luka pada kulit 5 hari setelah injuri. Tampak pembuluh darah mengarah ke bekuan darah dan sel epidermal menutup luka. Terdapat proteinase yang penting untuk pergerakan sel, antara lain: u-PA, MMP-1, 2, 3, and 13 dan t-PA (Singer et al., 1999)

Fase remodeling scar paling dominan dimulai pada 21 hari setelah injuri.

Sintesa kolagen berkurang dan mencapai taraf yang seimbang dengan penghancurannya. Penurunan sintesa kolagen diperantara oleh γ -interferon, TNF- α dan matriks kolagen itu sendiri. Remodeling merupakan fase yang paling lama terjadi pada proses penyembuhan luka, dapat berlangsung selama beberapa minggu sampai beberapa bulan. Selama fase ini pembuluh darah baru berkurang dan matriks sementara yang longgar akan digantikan oleh serabut kolagen yang kemudian disusun kembali oleh proteolisis dan reproduksi membentuk scar dengan adanya daya regang. Bila kolagen matriks sementara hampir seluruhnya adalah tipe III, maka selama proses penyembuhan luka akan didegradasi oleh aktivitas kolagenase dan digantikan oleh kolagen tipe I yang merupakan kolagen utama pada scar yang matur. Maturasi jaringan scar akan lengkap setelah kira-kira 1 tahun. Meskipun remodeling matriks ini memakan



Gambar 2.11. Fase remodeling (fase reepitelisasi dan neovaskularisasi) diperantara oleh sitokin. Degradasi kolagen fibrilar dan protein matriks yang lain dikendalikan oleh protease serin dan MMP (Singer et al., 1999)

Pada pemasangan implan nondegradable dengan permukaan yang

halus, fase perbaikan (repair) dan pengembalian (remodeling) bertujuan untuk mengisolasi implan dengan cara membentuk kapsul jaringan. Pembentukan kapsul jaringan dan peran seluler dalam reaksi imun memberikan hasil yang berbeda tergantung letak implantasi dan jenis jaringan yang ditempati oleh

implant. Saat ini sudah diketahui secara pasti bahwa proses penyembuhan luka memberikan efek merusak pada ketepatan dan ketahanan implant (Stroncek et al., 2008).

2.4 Proses Scarring

Proses penyembuhan luka melibatkan interaksi kompleks dari sel-sel mediator-mediator, *growth factor* dan sitokin yang menyebabkan proses keradangan, proliferasi sel-sel deposisi *ECM*, kontraksi dan *remodeling*. Pada keadaan abnormal dan hilangnya atau berubahnya urutan proses ini akan menyebabkan pembentukan *scar*, yang ditandai dengan deposisi *ECM* berlebih dan kadang terbentuk kontraktur (Manuskiatti *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Saw *et al.*, 2009).

Berdasarkan pengalaman klinis terbentuknya *scar* hipertropik merupakan bentuk penyimpangan penyembuhan luka berupa aktivitas fibroblas dan akumulasi *ECM* yang berlebihan selama periode penyembuhan luka. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) dan Prostaglandin E2 (PGE2) merupakan 2 sitokin yang terlibat dalam penyembuhan luka sebagai mediator lipid pada proses keradangan. Pada luka dengan *scar* yang berlebihan didapatkan produksi TGF- β dan PGE2 yang lebih besar dibandingkan pada penyembuhan luka normal (Tabel 2.1) (Su *et al.*, 2010).

Tabel 2.1 Kadar PGE2 dan TGF- β pada penyembuhan luka normal dan *scar*
(Su *et al.*, 2010)

Phases	Normal Healing Process			Excessive Scarring		
	1*	2	3	1	2	3
TGF-beta	↑	↑	↓	↑	↑↑↑	↑↑
PGE2	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↓↓	↓↓

*1=fase keradangan, 2= fase proliferasi, 3= fase remodeling.

Scarring terjadi pada jaringan yang tidak mampu beregenerasi, yakni jika

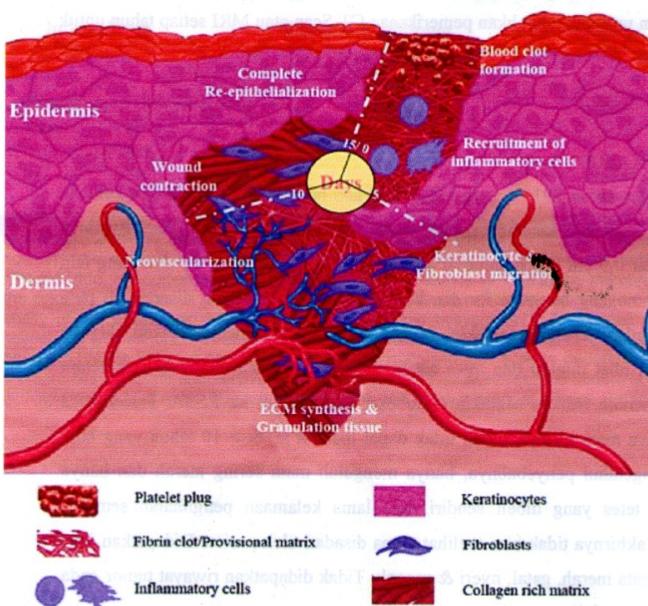
kerangka (*scaffold*) jaringan ikat hilang atau jaringan yang terluka tertutupi eksudat yang sangat banyak. Sedangkan regenerasi sel atau pertumbuhan jaringan merupakan proses menggantikan struktur yang hilang. Pada beberapa

jaringan, trauma yang terjadi dapat sembuh sempurna misalnya pada tulang atau luka superfisial pada epitel kulit. Pada jaringan yang tidak mampu melakukan regenerasi, pada proses perbaikan (*repair*) terjadi penumpukan *ECM* menghasilkan *scar*. Jika trauma terus terjadi maka inflamasi akan terjadi secara kronis dan kerusakan jaringan dan perbaikannya terjadi secara bersamaan. penumpukan *ECM* pada keadaan tersebut disebut *fibrosis*. Secara umum *fibrosis*

dapat terjadi pada beberapa penumpukan abnormal jaringan ikat (*connective tissue*) (Stroncek *et al.*, 2008).

Proliferasi sel, interaksi sel-sel dan sel-matrik serta penumpukan *ECM* yang terlibat pada penyembuhan luka juga mendasari terjadinya fibrosis yang berhubungan dengan penyakit keradangan kronis. Penyakit keradangan kronis ditandai dengan adanya injuri atau respon keradangan yang menetap. Pada sebagian besar kasus, interaksi limfosit-makrofag menyebabkan sintesa dan sekresi secara terus menerus berbagai *growth factor* dan sitokin fibrogen, protease dan molekul aktif lainnya, sehingga keradangan terus berjalan menyebabkan kerusakan jaringan yang progresif dan fibrosis (Su *et al.*, 2010).

Secara ringkas fase-fase penyembuhan luka dapat dilihat dari gambar 2.12. Pada 12-24 jam pertama setelah injuri ditandai dengan pembentukan plak platelet dan bekuan darah. Sel keradangan memasuki bekuan darah menyebabkan keradangan akut. Pada 5-10 hari terjadi repitelisasi disertai dengan migrasi dan proliferasi fibroblas dan sel endothelial membentuk jaringan granulasi. Fibroblas secara berfase menggantikan matrik sementara dengan matrik yang kaya kolagen dan berubah menjadi myofibroblas. Antara 10-15 hari setelah injuri terjadi transisi dari jaringan granulasi menjadi *scar*, sehingga terbentuklah jaringan *scar* kaya kolagen yang secara perlahan teremodeling dalam beberapa bulan dibawah permukaan luka yang akhirnya sudah tertutup epidermis baru (Telci *et al.*, 2006).



Gambar 2.12. Fase-fase penyembuhan luka. Pada 12-24 jam: pembentukan plak platelet dan bekuan darah. Pada 5-10 hari: repitelisasi dan granulası. Antara 10-15 hari: transisi dari jaringan granulası menjadi scar. Terbentuklah jaringan scar kaya kolagen dibawah permukaan luka yang sudah tertutup epidermis baru (Telci et al., 2006)

2.4.1 Patogenesis Scarring

Scar terjadi dalam fase awal terjadinya jaringan granulası. Tiga fase yang

terjadi yaitu fase pertama migrasi dan proliferasi fibroblas, kemudian fase kedua penumpukan ECM dan pembentukan scar, diakhiri fase ketiga remodeling jaringan. Pada fase pertama terjadi peningkatan permeabilitas vaskular yang menyebabkan penumpukan protein plasma misalnya fibronektin dan fibrinogen, membentuk matrik sementara untuk pertumbuhan fibroblas. PDGF, EGF, FGF dan TGF- β dan sitokin IL-1 dan TNF mengatur migrasi dan proliferasi fibroblas.

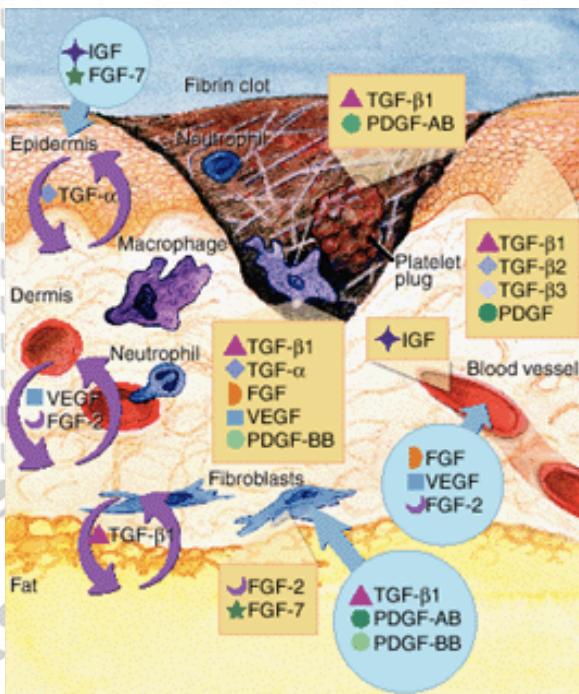
Fase kedua terjadi fase perbaikan semakin meningkat, jumlah sel endotel dan fibroblas yang berproliferasi menurun, deposit jaringan lebih banyak digantikan dengan kolagen dan komponen ECM yang lain. Sintesa ECM distimulasi oleh Growth Factor (misalnya PDGF, FGF, TGF- β) dan sitokin (misalnya IL-1) yang disekresikan oleh fibroblas dan leukosit pada luka yang menyembuh. Pada akhir fase ini kerangka jaringan granulası diubah menjadi scar yang terdiri dari

fibroblas dan kolagen. Kemudian dilanjutkan dengan fase ketiga yaitu remodeling jaringan, pada fase ini terjadi penggantian jaringan granulasi dengan scar yang pada akhirnya melibatkan perubahan pada komposisi ECM (Gambar 2.13). Selain mengendalikan sintesa ECM, berbagai *growth factor* juga memodulasi sintesa dan aktivasi Matrik Metaloproteinase (MMP), yang merupakan sekelompok enzim yang terdiri dari lebih 20 enzim. Enzim ini mendegradasi ECM, yang produksinya dihambat oleh TGF- β 1. MMP disekresikan sebagai proenzim dan diaktifkan ekstraselular dan memerlukan seng untuk aktivitasnya. MMP yang aktif akan segera dihambat oleh *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP). Hasil akhir efek sintesa ECM dan degradasinya menghasilkan pembersihan daerah luka dan remodeling kerangka jaringan ikat (Vaalamo, 2000; Monaco *et al.*, 2003; Takeuchi, 2011).

Penyimpangan penyembuhan luka dapat berupa penyembuhan yang terlambat atau berlebihan. Pada proses penyembuhan luka yang berlebihan akan terbentuk scar hipertropik. Hal ini didukung oleh beberapa penelitian tentang faktor-faktor penyembuhan luka (Manuskiatti *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011).

Pada proses penyembuhan luka terjadi fase keradangan akut yang menyebabkan infiltrasi sel keradangan, meningkatnya regulasi sitokin, migrasi fibroblas dan sel endotel vaskular dari jaringan sekitar pada fase proliferasi dan transformasi fibroblas menjadi myofibroblas dan fase remodeling yang memulai terjadinya scar fibrosa. Efek sitokin pada patogenesis terjadinya scar fibrosa masih banyak diteliti. Beberapa penelitian mempelajari *transforming growth factor- β* (TGF- β), *connective tissue growth factor* (CTGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *bone morphogenic proteins* (BMP) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Penghambatan angiogenesis dapat mengontrol terjadinya scar fibrosa yang berlebihan melalui pengaturan pembentukan jaringan

granulosa dan proliferasi fibrosa (Takeuchi, 2011).



Gambar 2.13. Proses penyembuhan luka dan sitokin yang melibatkan keradangan, epitelisasi, angiogenesis (Singer, 1999)

Aktivitas *growth factor* yang meningkat tidak hanya menyebabkan peningkatan kecepatan penyembuhan luka, tetapi juga beresiko yang lebih tinggi untuk terbentuknya scar. Pada jaringan *embryonic*, penyembuhan luka tidak menyebabkan scar (*scar-free healing*). Hal ini dimungkinkan oleh rendahnya sinyal *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) pada embryo dibanding dewasa, karena rendahnya kadar TGF- β 1 dapat mempercepat re-epitelisasi sehingga merangsang penyembuhan luka dan mengurangi sintesa kolagen, yang pada akhirnya akan mengurangi terjadinya pembentukan scar (Li et al., 2011). Sinyal TGF- β 1 melalui jalur Smad-dependen dan Smad-independen. Jalur Smad-dependen (Smad2/3) mengaktifkan perubahan seluler yang diinduksi TGF β , misalnya sintesa dan sekresi kolagen yang akan meningkatkan pembentukan scar. Jalur sinyaling Smad-independen (melalui Mitogen-activated protein kinase, phosphoinositide 3 kinase atau Rho/rho-associated kinase)

meningkatkan penyembuhan luka. Oleh karena itu, penghambatan TGF β dapat mengurangi terjadinya *scarring* tetapi juga menyebabkan terlambatnya proses penyembuhan luka (Yamanaka *et al.*, 2006; Ellis, 2009; Schachtrup *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Kawashima *et al.* (1998) menyebutkan kemungkinan adanya keterlibatan MMP dan TIMP pada fase remodeling jaringan ikat dan populasi sel fibroblas subkonjungtiva setelah intervensi bedah. Protein ini kemungkinan memiliki peran penting pada proses fibrotik setelah operasi yang terjadi selama pembentukan scar pada jaringan sub konjungtiva (Kawashima *et al.*, 1998).

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) dan activin adalah *growth factor* multi fungsi yang berefek pula pada penyembuhan luka dan fibrosis jaringan. Pada suatu studi disebutkan juga bahwa *BMP-6* dan *Activin-A* meningkat secara bermakna pada jaringan scar konjungtiva disbanding normal, sedangkan *growth factor* dan reseptor tidak menunjukkan perubahan yang berarti. Hal ini mendukung bukti bahwa penyimpangan ekspresi *BMP-6* dan *Activin-A* berhubungan dengan *scarring* konjungtiva (Krassimir *et al.*, 2006).

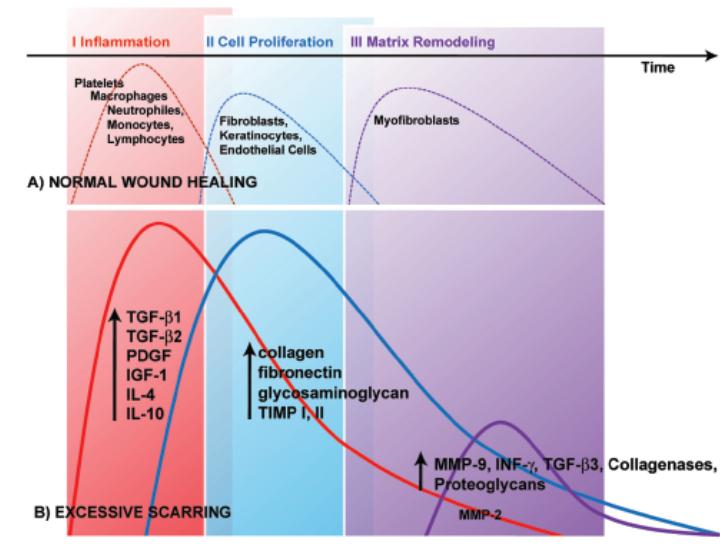
Activin-A merupakan *TGF- β* super family yang memiliki kadar tinggi pada berbagai proses keradangan dan fibrosis. *Activin-A* menunjukkan ekspresi yang berlebih pada jaringan keloid (Funayama, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Penelitian lain menyebutkan *growth factor* pada penyembuhan luka banyak diteliti dan dari sekian banyak *growth factor*, *TGF- β* super family merupakan *growth factor* yang memiliki peranan penting dalam pembentukan scar (Ochiai *et al.*, 2001).

Scar terbentuk melalui proses yang kompleks dan tersusun rapi yang terjadi selama proses penyembuhan luka dan dirangsang oleh kerusakan jaringan. Selama proses *scarring* jaringan yang rusak menyebabkan pengumpulan *ECM* melalui migrasi sel yang kemudian akan berdiferensiasi

menjadi myofibroblas yang kontraktil dan sel epithelial yang telah bertransformasi. Kerusakan jaringan mengawali kaskade penyembuhan luka, kemudian diikuti oleh fase inflamasi. Pada fase ini sel imun bermigrasi ke tepi luka, melepaskan faktor pro-inflamasi (sitokin, *growth factors* dan kemokin). *Growth factors* dan sitokin menstimulasi migrasi dan proliferasi sel ke tepi luka. Fase akhir pembentukan scar melibatkan remodeling ECM disekitar luka, diikuti pengumpulan protein matriks baru dibawah kontrol *growth factors* dan akhirnya terjadi kontraksi jaringan menjadi scar (Hsu *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011; Forte *et al.*, 2010).

Penyimpangan dalam penyembuhan luka sering akibat penyimpangan dalam deposisi kolagen. Bila terjadi sintesa kolagen yang berlebihan, maka dapat terjadi pembentukan scar. Matrik metaloproteinase (*MMP*) terlibat dalam penghancuran molekul kolagen yang terjadi selama proses remodeling. Namun demikian belum jelas benar peran *MMP* dalam proses penyembuhan luka (Monaco *et al.*, 2003).

Setiap fase pada proses penyembuhan luka yang menyebabkan pembentukan jaringan scar dikendalikan oleh sitokin dan *growth factor* keradangan. TGF- β memegang peranan terbesar pada setiap fase pada proses penyembuhan luka pada mata dengan meningkatkan sekresi *growth factor* yang terlibat pada migrasi sel, proliferasi, deposisi ECM dan pembentukan myofibroblas. Oleh karenanya TGF- β masih menjadi target kunci yang potensial untuk intervensi pengobatan proses scarring. Selain itu akan lebih baik bila dikombinasi dengan agen yang dapat menghambat aspek yang berbeda pada proses scarring. Agen ini dapat berupa anti keradangan yang dapat mencegah aktivitas sitokin dan *growth factor* keradangan atau mencegah migrasi dan proliferasi sel (Ellis *et al.*, 2009).



Gambar 2.14. Perbedaan antara penyembuhan luka normal dan pembentukan scar yang berlebihan. Pada luka normal terdapat keseimbangan biosintesa dan degradasi jaringan baru melalui apoptosis dan remodeling matrik ekstraseluler. Pada pembentukan scar yang berlebihan terjadi keradangan persisten yang menyebabkan sintesa kolagen yang berlebihan atau menurunnya degradasi dan remodeling matrik (Gauglitz et al., 2011)

Proses penyembuhan luka berlangsung mengikuti rangkaian waktu yang

spesifik dan dapat dibedakan menjadi 3 fase seperti telah disebutkan diatas yaitu keradangan, proliferasi dan remodeling. Degranulasi platelet bertanggungjawab dalam pelepasan dan aktivasi sitokin yang berperan sebagai agen kemotaktik untuk menarik makrofag, neutrofil, sel epithelial dan fibroblas. Pada luka normal terdapat keseimbangan antara biosintesa dan degradasi jaringan baru yang diperantai oleh apoptosis dan remodeling ECM. Pada pembentukan scar yang berlebihan terjadi disfungsi mekanisme pengaturan yang mendasari, sehingga terjadi keradangan persisten yang menyebabkan sintesa kolagen yang berlebihan atau menurunnya degradasi dan remodeling matrik (Gambar 2.14) (Gauglitz et al., 2011).

Hasil dari proses penyembuhan luka dapat berupa regenerasi jaringan, sehingga jaringan kembali normal atau terjadi fibrosis/ scar. Pada proses penyembuhan luka normal sebenarnya juga terjadi aktivasi dan proliferasi

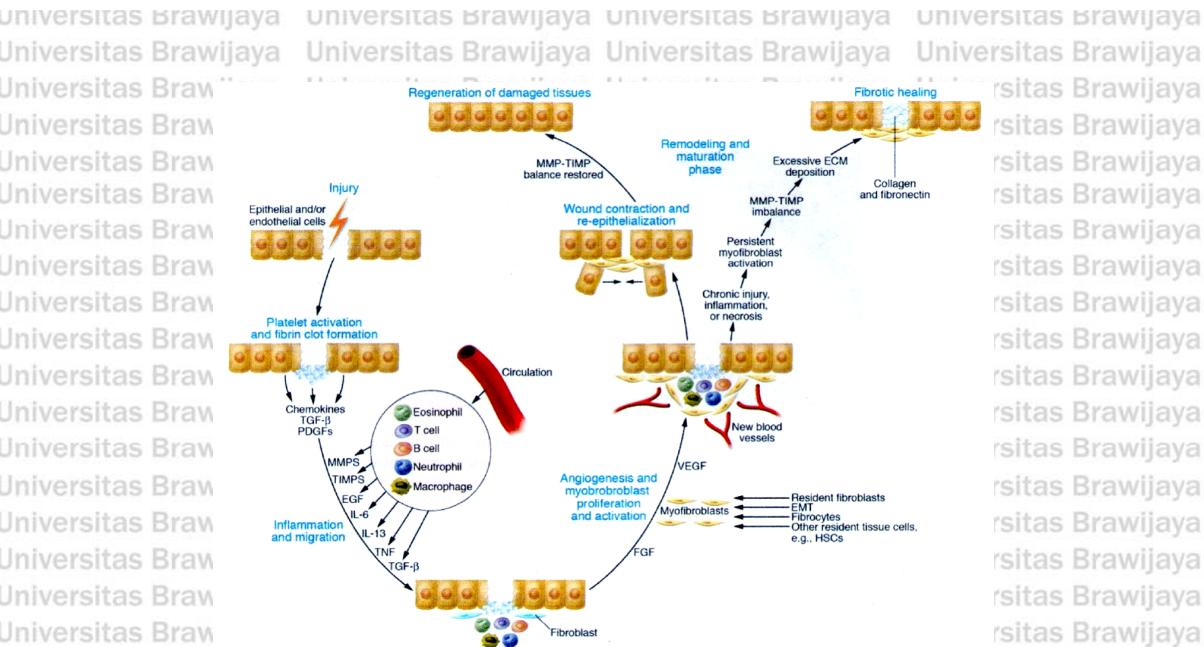
myofibroblas yang berperan pada kontraksi luka sehingga daerah injuri akan menyempit dan akhirnya menutup karena fase remodeling terjadi sempurna dengan seimbangnya peran MMP-TIMP menghasilkan jaringan yang teregenerasi dengan baik tanpa meninggalkan jaringan fibrosis (scar). Namun bila terjadi keradangan persisten, nekrosis jaringan dan infeksi menyebabkan aktivasi kronik myofibroblas dan penumpukan ECM, yang merangsang pembentukan scar yang berlebihan dan terjadi penyembuhan dengan jaringan fibrosis yang mengandung kolagen dan fibronektin (gambar 2.15) (Wynn *et al.*, 2007).

Pada luka yang sangat superfisial, epithelium akan tergantikan, sehingga scar yang terbentuk kecil. Pada luka yang lebih dalam, penyembuhan luka mungkin tidak dapat memberikan hasil yang sempurna secara fungsional.

Penyembuhan primer dapat terjadi bila tepi luka bertemu dengan baik atau aposisi. Tepi irisan luka operasi yang bersih dan beraposisi menyebabkan kematian sel dan kerusakan membran basemen yang minimal. Sedangkan penyembuhan sekunder terjadi pada luka dengan tepi luka yang terpisah.

Respon keradangan terjadi lebih hebat dan terbentuk jaringan granulasi yang berlebihan. Kemudian akan terbentuk scar yang luas dan epidermis dibawahnya akan menipis. Hal terpenting pada penyembuhan sekunder ditandai dengan kontraksi luka, sehingga defek yang terjadi lebih kecil dari ukuran sebenarnya.

Proses ini melalui aktivitas kontraktil dari myofibroblas (Su *et al.*, 2010).



Gambar 2.15. Hasil dari proses penyembuhan luka: regenerasi jaringan atau fibrosis. Pada proses penyembuhan luka normal tetap didapatkan aktivasi dan proliferasi myofibroblas yang berperan pada kontraksi luka, tetapi dengan seimbangnya peran MMP-TIMP akan terjadi remodeling sempurna dan jaringan teregenerasi dengan baik tanpa meninggalkan jaringan fibrosis (scar). Namun bila terjadi keradangan persisten, nekrosis jaringan dan infeksi menyebabkan aktivasi kronik myofibroblas dan penumpukan ECM, yang merangsang pembentukan scar yang berlebihan (Wynn et al., 2007)

Proses penyembuhan luka dikendalikan oleh sitokin dan *growth factor*

keradangan. *TGF- β* memegang peranan terbesar pada setiap fase pada proses

penyembuhan luka dengan meningkatkan sekresi *growth factor* yang terlibat pada migrasi sel, proliferasi, deposisi *ECM* dan pembentukan myofibroblas.

Proses penyembuhan luka menyebabkan pembentukan jaringan *scar*. *Growth factor*, khususnya *Transforming Growth Factor (TGF- β)*, memiliki peran terbesar dalam pembentukan jaringan *scar* dan merangsang sintesa *growth factor* yang mengontrol migrasi, proliferasi, produksi enzim dan pengumpulan matriks pada sel. Oleh karena itu diharapkan dimasa mendatang *growth factor* menjadi target utama yang dapat mencegah terjadinya proses *Scarring* pada mata (Ellis et al., 2009).

Growth factor, khususnya *Transforming Growth Factor (TGF- β)*, memiliki peran terbesar dalam pembentukan jaringan *scar* dan merangsang sintesa *growth factor* yang mengontrol migrasi, proliferasi, produksi enzim dan

pengumpulan matriks pada sel. Oleh karena itu diharapkan dimasa mendatang *growth factor* menjadi target utama yang dapat mencegah terjadinya proses *Scarring* pada mata (Ellis *et al.*, 2009). *Growth factor* berperan pada setiap fase proses penyembuhan luka yang dapat menyebabkan terbentuknya jaringan scar. Pada mata yang masih normal, proses *Scarring* pada mata dapat menyebabkan kebutaan atau penurunan tajam penglihatan karena terbentuknya matriks baru yang berwarna keputihan yang merupakan deposit jaringan ikat di organ penglihatan seperti lensa atau kornea. Selain itu, jaringan scar juga bersifat kontraktil sehingga akan mengganggu bentuk anatomis setelah proses penyembuhan luka. *Growth factor*, khususnya *Transforming Growth Factor* (TGF- β), memiliki peran terbesar dalam pembentukan jaringan scar pada mata dan merangsang sintesa *Growth factor* yang mengontrol migrasi, proliferasi, produksi enzim dan pengumpulan matriks pada sel. Oleh karena itu diharapkan dimasa mendatang *Growth factor* menjadi target utama yang dapat mencegah terjadinya proses *Scarring* pada mata (Ellis *et al.*, 2009).

Konsentrasi serum TGF- β 1 meningkat dalam 2 minggu setelah trauma.

Peningkatan ini dapat terjadi akibat absorpsi sitokin dari tepi luka. Namun dapat pula terjadi akibat dari respon sirkulasi terhadap adanya luka. Konsentrasi TGF- β 1 mulai turun kadarnya dan mencapai kadar yang relative tetap antara minggu 4 dan 8 (Sarahrudi *et al.*, 2011).

Diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas, diregulasi oleh TGF- β , sehingga hal ini memberikan dugaan bahwa ekspresi α -SMA secara simultan juga dipertahankan oleh TGF- β . Namun demikian, peningkatan aktivitas MMP-2 yang signifikan pada jaringan patologis tidak berkorelasi dengan ekspresi TGF- β 1 (Ratajczak-Wielgomas, 2012).

2.5 Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1)

TGF- β 1 memegang peranan penting dalam regulasi respon imun, proliferasi, diferensiasi dan migrasi sel, proses penyembuhan luka, hemostasis vaskular dan fibrosis. Pada mamalia terdapat 3 isoform TGF- β yang dikode oleh gen yang berbeda yaitu TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3 (Pohlers *et al.*, 2009; Anscher; 2010; Shao *et al.*, 2011; Kuchtey *et al.*, 2014).

TGF- β 1 merupakan isoform predominan di plasma, sedangkan TGF- β 2

berperan pada kelainan yang berhubungan dengan imunitas di bilik mata depan.

Namun demikian TGF- β 1 juga tampak meningkat pada humor akuos, meskipun

kadaranya lebih rendah dibanding TGF- β 2 (Anscher; 2010; Kuchtey *et al.*, 2014).

p38 mitogen-activated protein kinase dapat berperan sebagai kelanjutan (downstream) sinyal TGF- β 1 dalam diferensiasi sel. Namun mekanisme molekuler pencetus dan regulasinya masih belum jelas. TGF- β 1 berinteraksi dengan jalur sinyaling lain seperti Wnt/ β -katenin dan Rho untuk menginduksi efek biologis yang lain. TGF- β 1 mengaktifkan sinyaling β -katenin, meningkatkan translokasi β -katenin nuclear dan berinteraksi dengan transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) untuk meregulasi ekspresi gen. Perubahan morfologis yang merespon TGF- β 1 berhubungan dengan aktivasi Rho GTPase, namun dihambat oleh Rho kinase inhibitor, yang merupakan target downstream utama Rho. Hal ini memberikan dugaan bahwa jalur Wnt/ β -katenin dan Rho memediasi jalur downstream meskipun sinyaling dirangsang oleh TGF- β 1 (Shao *et al.*, 2011).

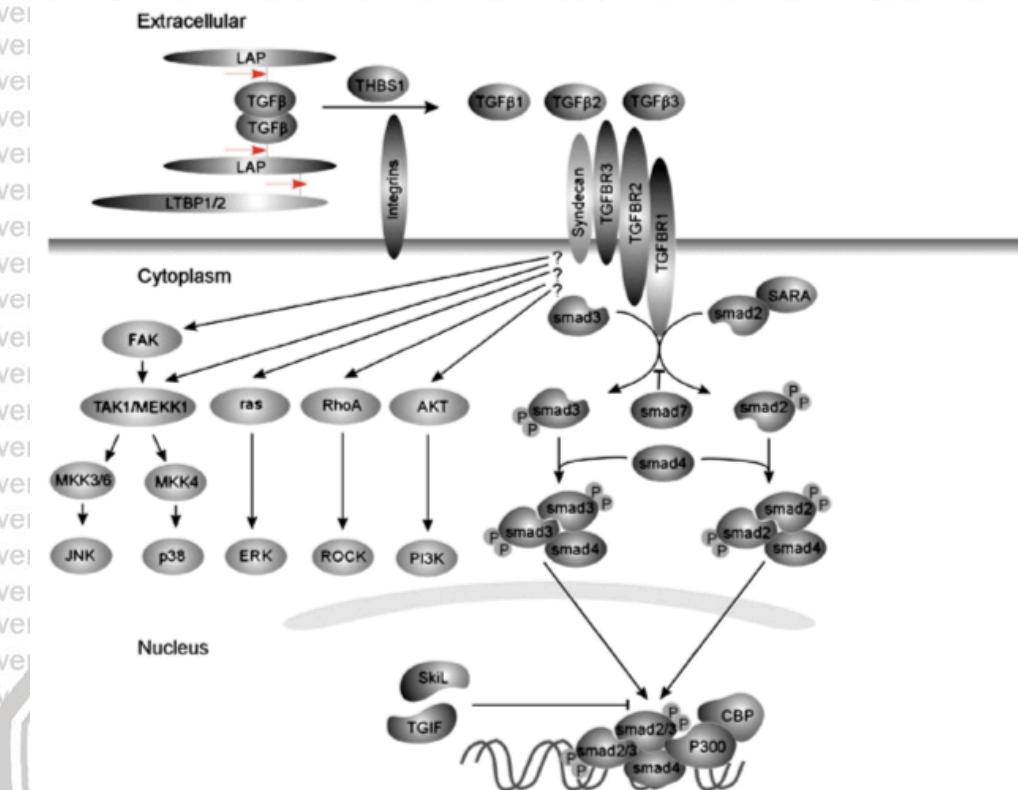
Pelepasan TGF- β dari komplek pro-TGF- β terjadi melalui aktivitas proteolitik oleh plasmin, matrik-metalloproteinase (MMP)-2 dan MMP-9 melalui integrin, perlakuan asam lemah atau melalui peran thrombospondin (THBS) yang menghilangkan interaksi non kovalen antara LAP dan TGF- β 1. Setelah dilepaskan, TGF- β memediasi sinyal melalui reseptor tipe I dan tipe II. Reseptor

tipe III (*betaglycan*) berperan sebagai ko-reseptor untuk mengikat TGF dan sebagai regulator sinyaling TGF- β . Ikatan ligan menyababkan aktivasi reseptor tipe II (TGFBR2), kemudian memfosforilasi reseptor tipe I (TGFBR1). Kompleks reseptor aktif memfosforilasi reseptor Smad2 or Smad3 untuk terjadinya sinyaling selanjutnya. Kompleks ini kemudian memasuki inti sel, mengikat ko-aktifator atau represor transkripsional dan meregulasi aktivitas transkripsi berbagai gen (Shao *et al.*, 2011).

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) and protein kinase C berpengaruh pada translokasi inti sel atau ikatan kompleks Smad 3/4 ke DNA dan meregulasi sinyaling TGF- β 1. Selain itu serine-threonine protein kinase B dapat berinteraksi dengan Smad3 secara langsung, dengan demikian akan terjadi fosforilasi dan translokasi inti sel. Jalur yang lain dapat diaktifasi secara langsung oleh TGF- β 1. Termasuk komponen jalur MAPK seperti ras, raf, ERK, p38 dan JNK, kaskade phosphatidylinositol-3 kinase serta regulator penghubung cadherin, RhoA dan Rac. *Focal adhesion kinase* (FAK) terlibat diferensiasi myofibroblas dan remodeling jaringan ikat setelah stimulasi TGF. Sinyaling FAK yg dinduksi TGF diperlukan untuk aktivasi MEKK dan kemudian JNK. Semua faktor tersebut penting dalam transkripsi gen pro-fibrotik. Jalur sinyal transduksi ini memiliki regulator intraseluler nya sendiri. Smad inhibitor (Smad7) menghambat sinyaling TGF- β 1 melalui interaksi dengan reseptor TGFBR1 aktif dan mencegah penempelan dan fosforilasi Smad 2/3 (Gambar 2.16) (Pohlers *et al.*, 2009; Garg, 2015).

Pada penelitian *in vivo*, TGF- β 1 eksogen meningkatkan jaringan granulasi, pembentukan kolagen dan ketegangan luka, baik diberikan secara lokal maupun sistemik. Peningkatan kadar TGF- β terjadi baik pada penyembuhan normal maupun pada proses fibropatologi. Terdapat golongan TGF- β yang tidak menyebabkan deposisi matrik ekstraseluler yaitu TGF- β 3

yang berhubungan dengan *scarless fetal healing* (Pohlers et al., 2009).



Gambar 2.16. Molekul pada jalur TGF- β . Terjadi pelepasan TGF- β , mengikat reseptor, sinyaling melalui Smad, FAK dan MAPK, memasuki inti sel dan meregulasi aktivitas transkripsional (Pohlers et al., 2009)

Berbagai molekul bioaktif berperan dalam sinyaling selama proses fisiologis atau patologis, termasuk TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*), IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) dan berbagai *growth factors* angiogenik. TGF- β 1 merupakan mediator penting dalam remodeling matrik ekstraseluler yang terlibat dalam regulasi proliferasi, diferensiasi, migrasi, apoptosis, fungsi imun dan morfogenesis sel. P38 berpengaruh pada fosforilasi Smad2/3 selama sinyaling TGF- β 1 dan ERK1/2 juga terlibat dalam proses ini (Schnaper, 2003; Pohlers et al., 2009; Shao et al., 2011; Liao et al., 2015; Wu, 2015).

Proses diferensiasi dan migrasi juga dimediasi oleh jalur sinyaling yang melibatkan Wnt dan Rho GTPase. Wnt menempel pada reseptor sel untuk

mengaktifkan sinyaling berbeda termasuk jalur transkripsi β -katenin-dependent (jalur kanonikal), merangsang pelepasan jalur kalsium intraseluler (Wnt–Ca²⁺) dan inisiasi PCP (*planar cell polarity*)/ jalur ekstensi konvergen. Rho GTPase terdiri dari Rho, Rac dan Cdc42, yang dibutuhkan dalam proses berdasarkan sitoskeleton. Sinyaling TGF- β 1 juga melewati jalur Rho/Rock, yang secara tersendiri merupakan kaskade transduksi sinyal Smad (Shao et al. 2011).

Jalur Wnt dan Rho GTPase memiliki hubungan saling terkait. Jalur non kanonikal Wnt berperan pada perubahan sitoskeleton menyebabkan pergerakan dan polaritas sel. Pada proses non kanonikal ini sebagian merupakan peran aktivasi Rho GTPase. Rho GTPase juga berperan pada sinyaling kanonikal. Rac1 meregulasi transkripsi oleh β -katenin- dependent selama diferensiasi. Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara TGF- β 1, β -katenin dan Rho GTPase.

Hubungan antara β -katenin dan Rho GTPase dapat menyebabkan migrasi dan diferensiasi yang diinduksi oleh TGF- β 1 (Shao et al., 2011).

TGF- β 1 dapat menginduksi aktivasi β -katenin dan Rho GTPase, Rho GTPase meregulasi transkripsi β -katenin-dependent dan berinteraksi dengan jalur β -katenin dengan berbagai cara. Selain itu, β -katenin dan Smad yang ada pada sitoplasma nucleus terlibat pada keseluruhan proses. Aktivasi Rho dan inhibisi ROCK menginduksi perlengketan sitoskeleton dan meningkatkan migrasi sel. Dapat dipertimbangkan bahwa β -katenin dan Rho berperan besar dalam repair sel. Kemungkinan TGF- β 1 dilepaskan dari sel dan matrik ekstraseluler mengaktifkan Rho GTPase untuk memfasilitasi motilitas sel selama awal periode luka. Bersamaan dengan itu hubungan Rho dg Wnt/ β -katenin mengendalikan diferensiasi sel. Saat sel bermigrasi ke tepi luka, TGF- β 1 berperan bersama jalur sinyaling yang lain misalnya MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) melalui Smad untuk mempromosi diferensiasi dan proliferasi sel (Shao et al., 2011; Stankiewicz, 2014).

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) merupakan proses yang penting dalam pertumbuhan, karsinogenesis dan fibrosis. EMT digambarkan sebagai hilangnya polaritas apical-basal sel epithelial, downregulasi marker epitel termasuk E-cadherin dan disolusi ikatan sel-sel. Perubahan ini menyebabkan adesi berubah menjadi interaksi sel-matrik yang disertai perubahan morfologis yang drastic dan terjadi upregulasi berbagai protein sitokleletal yang berperan pada peningkatan motilitas sel. Program myogenik dapat diaktifkan selama EMT karena adanya ekspresi protein alpha smooth muscle actin (α SM), peningkatan kontraktilitas selular dan penambahan fenotipe myofibroblas (Connor *et al.*, 2016). TGF- β 1 sebagai sitokin yang paling banyak diekspresikan merupakan inducer EMT yang poten. Paparan TGF- β 1 pada sel epitel tidak cukup menginduksi terjadinya EMT, namun harus disertai hilangnya kontak sel-sel. TGF- β 1 dapat menyebabkan EMT disepanjang tepi luka karena kontak sel-sel telah berkurang atau hilang. Kerusakan ikatan sel-sel akibat berkurangnya kadar kalsium atau downregulasi E-caderin. Kadar kalsium memiliki berbagai efek pada fungsi sel baik secara langsung maupun tak langsung, seperti mempertahankan ikatan sel, sebagai *second messenger* berbagai jalur sinyal transduksi termasuk transkripsi gen dan kontraksi. Adesi sel-ECM dan area penyebaran sel penting sebagai regulator pertumbuhan myofibroblas dari sel epitel selama EMT yang diinduksi TGF- β 1 (Connor *et al.*, 2016).

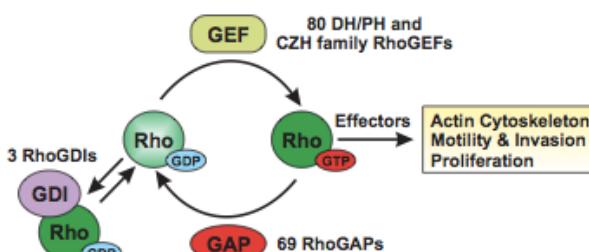
2.6 **Rho GTPase**

Pada genome manusia terdapat 20 protein Rho, sedang yang paling baik dipelajari adalah Rac1, Cdc42 dan RhoA. Setiap jenis sel mengekspresikan komplemen protein Rho yang berbeda. Fungsi Rho GTPase adalah sebagai pengubah molekular antara GTP-bound aktif dengan GDP-bound inaktif. Protein Rho sangat lambat dalam perubahan nukleotida dan membutuhkan protein

regulator yang besar untuk berfungsi didalam sel. Pada manusia *Rho guanine nucleotide exchange factors* (RhoGEFs) yang mengkatalisasi pelepasan GDP, dan kemudian merangsang ikatan GTP. Selain itu terdapat pula *Rho guanine nucleotide activating proteins* (RhoGAPs). Kedua family protein regulator tersebut menunjukkan perbedaan yang besar dalam afinitas, mekanisme regulatori dan distribusi jaringan. *GTPase exchange factors* (GEF) meningkatkan perubahan ikatan GDP menjadi GTP dan *GTPase-activating protein* (GAP), meningkatkan hidrolisis ikatan GTP (gambar 2.17) (Shao *et al.*, 2011; Tovell, 2011; Zuo, 2015; Ota *et al.*, 2015; Holmes, 2016; Fritz, 2016).

Rho GDP-dissociation inhibitor (RhoGDI) meregulasi sinyaling Rho GTPase dan dapat berfungsi sebagai regulator negatif dan positif. Fungsi GEF dan GAP terintegrasi dalam sinyaling Rho GTPase melalui interaksi regulator ini dengan GDI. Peran negative GDI adalah menekan semua aktivitas Rho melalui penghambatan GEF. Sedangkan peran positif GDI adalah mendukung aktivasi Rho dengan menghambat GAP. Perubahan antara aktivasi Rho transient and sustained terjadi terutama melalui perubahan afinitas GDI terhadap GAP dan konsentrasi GAP (Schlessinger, 2009; Ota *et al.*, 2015; Holmes, 2016).

TGF- β 1 menginduksi perubahan morfologis melibatkan aktivasi RhoA dan efeknya dihentikan oleh inhibitor ROCK. TGF- β 1 membentuk hubungan dengan Rho GEF untuk mengaktifkan Rho GTPase. TGF- β RII berperan pada RhoA memalui penambahan Smurf1 untuk meregulasi dinamik *adherens junctions* and *sitoskeleton*. Smad3 mengaktifkan sinyaling Rho untuk motilitas sel melalui induksi Dvl (disheveled). Hubungan TGF- β 1 dan Rho bertanggungjawab terhadap dinamika actin (Shao *et al.*, 2011).



Gambar 2.17. Regulasi sinyaling Rho GTPase oleh GEF, GAP dan GDI. Rho GTPase dirubah dari Rho GDP oleh GEF dan dapat kembali menjadi Rho GDP oleh GAP (Zuo, 2015)

Rho GTPase merupakan mediator penting dalam regulasi perubahan fenotip sel dan migrasi sel. Migrasi sel penting dalam pertumbuhan, penyembuhan luka dan daya tahan. Kekuatannya awal untuk migrasi adalah protusi sel, adesi sel-substrat, remodeling sitoskeleton dan pelepasan sel-substrat. Migrasi sel merupakan perubahan dinamis perlekatan dan pelepasan. β -katenin merupakan pengait adesi molekul (cadherin) untuk sitoskeleton dan berfungsi pula sebagai sinyaling seluler. Hal ini menggambarkan kemungkinan keterlibatan sinyaling Wnt/ β -katenin dengan Rho GTPase (Shao et al., 2011; Holmes, 2012).

β -katenin dan Rho berinteraksi untuk meregulasi induksi transkripsi gen target Wnt3A. Rac1 meregulasi β -katenin-dependent transcription selama differentiasi. Rho GTPase memegang peranan penting pada jalur kanonikal Wnt, namun hubungan antara Rho GTPase dan β -katenin rumit (Li et al., 2011; Shao et al., 2011).

Fibroblas yang kontraksi mereorganisasi komponen sitoskeletalnya untuk

membentuk *tensile strength* yang penting perannya dalam scarring post operasi. Aktivasi Rho terutama merangsang pembentukan *stress fiber* dan adesi fokal, sedangkan Cdc42 dan Rac merangsang pembentukan *filopodia and lamellipodia*. Rac1 dapat menginduksi protusi membran plasma melalui aktivasi polimerisasi aktin. Aktivitas Rac1 sangat penting dalam aktivitas protusi, perbaikan jaringan dan penyembuhan luka. Aktivitas protusi ini merupakan komponen penting dalam

kontraksi matrik. Hal ini menunjukkan sinyaling melalui Rac1 merupakan komponen utama dalam *contractile scarring* (Tovell, 2011).

Pada penelitian oleh Tovell (2011) didapatkan hasil bahwa penghambatan Rac1 menurunkan kontraksi matrik fibroblas tenont sebaik kontraksi jaringan pada ex vivo. Hal ini menunjukkan peran penting Rac1 dalam *scarring ocular* (Tovell, 2011).

Aktin filamen terdiri dari filopodia, lamellopodia dan *actin stress fibers*.

Actin stress fibers merupakan aktin filament yang melalui sel dan mengikat ECM melalui fokal adesi. Regulasi polimerisasi aktin sebagian besar dilakukan oleh Rho GTPase. Kelompok Rho berperan pada regulasi sinyaling inti. Pada ginjal manusia, protein Cdc42 dan Rho dapat menginduksi JNK, namun tidak dengan Rac. JNK tidak diaktivasi dengan baik oleh mitogen, namun sangat kuat diaktivasi oleh sitokin keradangan, TNF α , IL-1 dan stress pada sel. Belum diketahui dengan jelas molekul yang menghubungkan Rac dan Cdc42 GTPase dengan JNK dan p38. Beberapa molekul yang mungkin terlibat diantaranya SEK1, PAK dan MLK3 (Van Aelst, 1997; Wu, 2015).

Ligan Wnt dan reseptornya berperan penting dalam berbagai proses seluler dan fisiologis. Selama pertumbuhan, Wnt mengontrol diferensiasi, proliferasi, migrasi dan patterning. Sedang pada dewasa Wnt meregulasi hemostasis jaringan, terutama efeknya terhadap proliferasi dan diferensiasi sel punca. Rho GTPase merupakan mediator sinyal Wnt terutama pada jalur nonkanonikal yang terlibat polarisasi perubahan bentuk sel dan migrasi. Namun

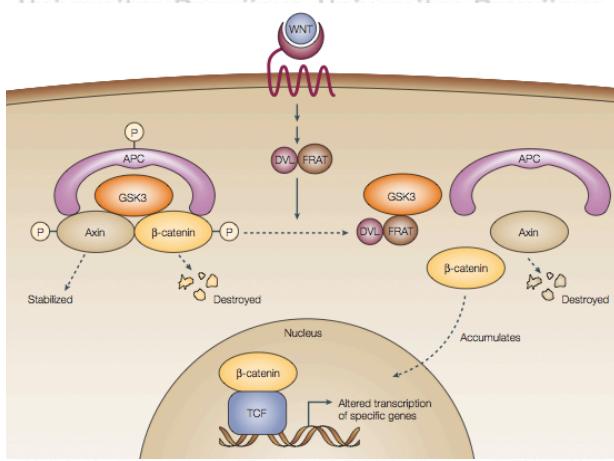
Rho GTPase juga berperan pada jalur kanonikal untuk terjadinya transkripsi yang tergantung β -katenin. Hal ini menunjukkan bahwa Rho GTPase berintegrasi dengan sinyal yang diinduksi oleh Wnt untuk terjadinya perubahan morfologi dan transkripsional yang mempengaruhi perilaku sel (Schlessinger, 2009).

2.7 Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) adalah protein kinase serine/threonine dan mengkatalisis fosforilasi lebih dari 100 substrat. GSK3 merupakan enzim yang selalu aktif didalam sel, kemungkinan karena GSK3 dikatalisis oleh protein kinase C (PKC). Inhibitor fisiologis GSK3 diantaranya Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt /phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)/Akt, lipid-binding protein perilipin 2 (PLIN2)/adipose differentiation-related protein (ADRP). Pada PI3K/PDK1/Akt, Akt diaktifkan oleh PDK1 dan PDK1 kemudian diaktifkan oleh PI3K-generated 3-phosphorylated phosphoinositides. PI3K/Akt/GSK3 jalur regulatori utama sinyaling ekstraseluler dan intraseluler untuk pertumbuhan, pertahanan, regenerasi dan kematian sel (Jope, 2007; Kirby *et al.*, 2012; Beurel, 2014).

GSK3 dapat merangsang inflamasi dan berperan penting pada proses penuaan dan age-related macular degeneration. Aktivitas GSK3 yang tinggi kemungkinan berhubungan dengan beberapa penyakit kronik misalnya acquired immune deficiency syndrome (AIDS), penyakit kardiovaskular (CVD), penyakit hati, penyakit paru dan ginjal (Kirby *et al.*, 2012; Liu, 2016).

Empat mekanisme yang berperan dalam regulasi aksi GSK3 yaitu regulasi melalui fosforilasi GSK3, lokalisasi GSK3 subseluler, pembentukan komplek protein yang mengandung GSK3 dan fosforilasi substrat GSK3. Terdapat 2 regulator serin pada 2 isoform GSK3 yaitu serin-9 pada GSK3 β dan serin-21 pada GSK3 α . Jalur sinyaling Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt aktif karena respon terhadap insulin dan berbagai growth factors sering merupakan regulator utama GSK3 karena Akt memfosforilasi GSK3 dengan menghambat residu serin, namun beberapa kinase juga dapat memfosforilasi regulator serin, seperti protein kinase C and protein kinase A. GSK3 menjadi kunci jalur sinyaling insulin dan Wnt (Jope, 2007).



Gambar 2.18. Mekanisme sinyaling Wnt dapat menginhibisi GSK3, akumulasi β -catenin dan aktivasi transkripsi gen. Beberapa jalur sinyal transduksi masih belum jelas, namun tampak keterlibatan sinyaling Wnt dalam regulasi gen sel dewasa (Cohen, 2012)

GSK3 juga dihambat oleh Wnt untuk mensekresikan glikoprotein. Fungsi

ini dalam sebuah jalur sinyaling sangat penting dalam menentukan kekhususan

sel selama pertumbuhan embryo. Tujuan sinyaling Wnt adalah GSK3 subseluler

yang bergabung dengan protein axin, β -catenin dan adenomatous polyposis coli

(APC). Kompleks protein ini dirusak selama sinyaling Wnt, sebagai hasil dari

penggantian posisi axin oleh protein lain seperti dishevelled dan FRAT

(Frequently Rearranged Advanced T-cell lymphoma, disebut juga GBP (GSK3-

binding protein)). Hal ini mencegah GSK3 dari fosforilasi axin dan β -catenin,

namun tidak oleh substrat lain seperti glikogen sintase dan eIF2B. Defosforilasi

berikutnya oleh β -catenin mencegah keberadaannya dimana-mana oleh β TrCP1,

mengawali akumulasi dan translokasinya di dalam inti sel, sehingga menstimulasi

transkripsi gen yang dibutuhkan selama pertumbuhan embryo (Gambar 2.18)

(Cohen, 2012).

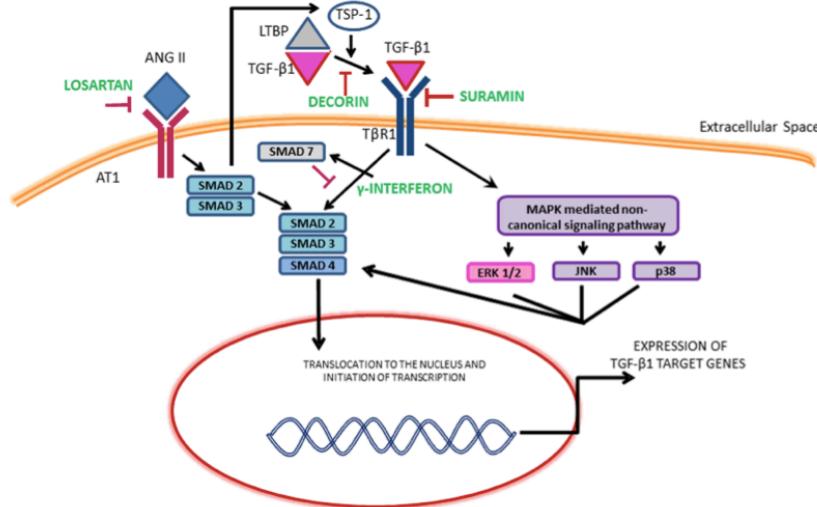
2.8 Jun N-Terminal Kinase (JNK)

Jun N-terminal kinase (JNK) merupakan protein kinase yang diaktifkan

oleh stress. Dapat pula dinduksi oleh sitokin, endotoksin bakteri, osmotic shock,

radiasi UV dan hipoksia. JNK adalah protein kinase serine/threonin yang memfosforilasi c-Jun, salah satu komponen faktor transkripsi activator protein-1 (AP-1). AP-1 meregulasi transkripsi beberapa gen termasuk sitokin (IFN-gamma, IL-2) dan tumor necrosis factor (TNF)- α , growth factor (vascular endothelial growth factor (VEGF)), immunoglobulin (kappa light chain), enzim keradangan (COX-2) dan matriks metalloproteinase (MMP-13). JNK adalah anggota family mitogen-activated protein kinase (MAPK), termasuk juga extracellular signal-regulated kinase (ERKs) dan p38 kinase. JNK meregulasi berbagai aktivitas pertumbuhan dan fungsi sel. JNK-1 dan JNK-2 terdapat pada berbagai jaringan, sedang JNK-3 terbatas pada jaringan syaraf, jantung, pankreas dan testis. JNK memiliki peran utama pada modulasi aksi insulin dan merupakan komponen penting pada patogenesis obesitas, penyakit fatty liver dan diabetes tipe 2. Selain itu JNK mengontrol jalur respon inflamasi yang utama dan diaktifkan oleh berbagai stress signal. Tidak seperti apoptosis dan keradangan, data JNK dalam fibrosis jaringan masih sangat kurang. Pada penelitian *in vitro* menunjukkan sinyaling JNK dalam produksi *TGF- β 1-induced fibronectin* di fibroblas dan dalam produksi *TGF- β 1 induced connective tissue growth factor (CTGF)*. JNK memiliki peranan penting dalam aktivasi faktor transkripsi, stabilisasi mRNA dan proses apoptosis serta proliferasi sel. Penghambatan JNK potensial pada kelainan sel akut seperti kematian sel dan penyakit keradangan (Chou *et al.*, 2007; Slipicevic 2010; Zhang *et al.*, 2012; Bulut *et al.*, 2015).

Pada jalur kanonikal TGF- β 1, ikatan ligan dimulai dengan fosforilasi SMAD2 dan SMAD3 yang kemudian berikatan dengan mediator SMAD4 dan translokasi ke nucleus untuk mengaktifkan transkripsi kolagen. SMAD7 mensupresi aksi ini. TGF- β 1 juga memiliki sinyal melalui induksi jalur non-kanonikal termasuk mitogens activated protein kinase (MAPK). MAPK terdiri dari isoform extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase



Gambar 2.19. Jalur sinyaling TGF- β 1. Ikatan TGF- β 1 memulai fosforilasi dengan SMAD2 dan SMAD3 yang kemudian SMAD4 dan translokasi ke nucleus untuk mengaktifkan transkripsi kolagen. SMAD7 mensupresi aksi ini. TGF- β 1 juga melalui induksi jalur MAPK (Garg, 2015)

2.9 Matrik Metaloproteinase-2 (MMP-2)

Matrik metaloproteinase-2 (MMP-2) adalah anggota family MMP yang memiliki berat molekul 75 kDa, disebut gelatinase A atau kolagenase tipe IV. Enzim ini disekresikan pada ekstraselular untuk mencerna kolagen tipe I, IV dan V, fibronektin, elastin dan beberapa proteoglikan termasuk dekorin (DCN).

Secara normal MMP-2 berhubungan dengan remodeling jaringan ECM. Diproduksi terutama oleh fibroblas dan disekresikan dalam bentuk inaktif, yang kemudian dipecah menjadi bentuk aktif dengan berat molekul 62 kDa. MMP-2 merupakan MMP yang disekresikan dengan aktivitas genolitik dan ditandai

dengan modulasi fibronektin tipe II pada domain peptidase (Ratajczak-Wielgomas, 2012). MMP atau matrixin adalah enzim endopeptidase yang terdiri dari 25 gen MMP pada manusia, dan sebagian besar adalah protein multidomain. MMP mengandung prodomain, domain katalitik, daerah hinge dan domain hemopexin. MMP disebut juga *matrixin*, merupakan protease yang disekresikan atau berikatan dengan membran sel yang memiliki kesamaan secara fungsional dan struktural terutama adanya ikatan Zn⁺⁺ pada sisi katalitiknya. MMP termasuk *zinc dependant endonucleases* (Leung, 2008; Roy, 2009; Suojanen, 2009; Ugalde et al., 2010).

Dari semua MMP, gelatinase-A (MMP-2) and gelatinase-B (MMP-9) adalah MMP yang dapat mendegradasi protein ECM, termasuk kolagenase tipe IV. Aktivitas kedua MMP ini dapat dihambat oleh TIMP-1 dan -2, walaupun TIMP ini juga berperan dalam aktivasinya. Sebenarnya remodeling matriks ini tergantung pergeseran keseimbangan antara MMP aktif dan TIMP. Regulasi yang teratur antara protease dan anti protease ini sangat dibutuhkan untuk mempertahankan bentuk jaringan (Vasala, 2008; Wong, 2008).

Scar hipertropik merupakan bentuk penyimpangan penyembuhan luka berupa aktivitas fibroblas, deposisi kolagen dan akumulasi ECM yang berlebihan selama periode penyembuhan luka. Matrik metaloproteinase (MMP) terlibat dalam penghancuran molekul kolagen yang terjadi selama proses remodeling. Namun demikian belum jelas benar peran MMP dalam proses penyembuhan luka (Ugalde et al., 2010; Rohani 2015).

Selain mengendalikan sintesa ECM, berbagai growth factor juga memodulasi sintesa dan aktivasi MMP. Enzim ini mendegradasi ECM, yang produksinya dihambat oleh TGF-β. MMP disekresikan sebagai proenzim dan diaktifasi ekstraselular. MMP yang aktif dihambat oleh *Tissue Inhibitors of*

Metalloproteinases (TIMP). Proses penyembuhan luka melibatkan berbagai jenis sel. Kerja sel-sel ini diatur oleh berbagai faktor diantaranya *growth factor*, sitokin, kemokin dan protease khususnya Matriks metaloproteinase (MMP). MMP berperan sejak pada fase proliferasi dan berperan sangat besar pada fase remodeling. Beberapa fungsi MMP ini adalah mendegradasi ECM dan membantu pembentukan pembuluh darah baru dan membantu myofibroblas mengontraktsikan matriks scar. Pada proses pembentukan scar hipertropik diantaranya terjadi ketidakseimbangan pengaturan MMP dan aktivitas *TGF- β* yang berlebihan (Ugalde *et al.*, 2010).

Pada manusia, perubahan pada MMP-2, MMP-3 dan MMP-9 diduga juga terlibat pada proses penyakit glaukoma. Didapatkan peningkatan aktivitas MMP-2, MMP-3 dan MMP-9 pada mata glaukoma dibandingkan mata normal.

Perubahan pada aktivitas MMP didapatkan pada humor aqueous, jaringan sudut iridokorneal dan kapsul tenon pada pasien dengan glaukoma sudut terbuka primer (POAG), glaukoma sudut tertutup primer (PACG) dan glaukoma eksfoliasi (Ito *et al.*, 2006). Perubahan ekspresi gen MMP juga didapatkan pada mata dengan peningkatan tekanan intraokular (Weinstein, 2009).

Degradasi yang berlebihan pada matriks vaskular oleh MMP akan menyebabkan tidak stabilnya Pada mata, kegagalan operasi sering terjadi karena terjadinya kontraksi dan jaringan parut (scar). Beberapa terapi untuk mencegah hal ini sudah dilakukan tetapi justru terjadi proliferasi sel, efek sitotoksik dan komplikasi pengobatan. Oleh karenanya pemahaman yang detail tentang penyembuhan konjungtiva dan proses kontraksi serta efek berbagai modulator proses scarring diperlukan sebagai dasar penelitian untuk menemukan terapi baru. Beberapa penelitian menitik beratkan pada kontraksi *fibroblast-populated collagen lattice* yang diinduksi oleh *Human Tenon Fibroblasts (HTF)*, yang saat ini dipercaya sebagai sel kunci yang terlibat pada respon penyembuhan luka.

subkonjungtival. Sitokin TGF $\beta 2$ tampak menstimuli kontraksi oleh HTF, hal ini didapatkan pada penelitian yang menggunakan penghambat TGF $\beta 2$ untuk menghambat kontraksi. Kontraksi jaringan tidak akan terjadi bila terdapat degradasi matrik. Degradasi matrik yang sangat dapat terjadi pada sampel yang diberikan TGF $\beta 2$, degradasi dan kontraksi ini dapat dicegah bila diberikan GM6001 sebagai inhibitor MMP. MMP memiliki peranan penting pada kontraksi jaringan. Karena MMP (khususnya kolagenase) menunjukkan respon penyembuhan luka yang penting dan beberapa penelitian sedang fokus untuk mempelajari inhibitor MMP ini untuk mencegah jaringan parut setelah operasi pada mata, maka diduga degradasi kolagen melalui aktivasi MMP merupakan penyebab terjadinya kontraksi. Proses ini akan sepenuhnya dihambat oleh GM6001 sebagai inhibitor MMP (Tovell, 2011).

MMP diproduksi saat kontraksi *Tenon's capsule fibroblasts-mediated collagen lattice*. Inhibisi pada MMP dapat mengurangi kontraksi dan produksi matriks, sehingga dapat mengurangi fungsi fibroblas yang menyebabkan jaringan parut kontraktif (Daniels *et al.*, 2003).

Mekanisme regulasi MMP yaitu regulasi sintesa oleh growth factor dan sitokin, inhibisi sintesa oleh kortikosteroid atau *transforming growth factor β* (TGF- β), regulasi aktivasi oleh precursor yang disekresikan tetapi masih inaktif dan blokade enzim secara spesifik dilakukan oleh *Tissue Inhibitors of Metallo Proteinases (TIMP)* (Jones *et al.*, 2004). Regulasi aktivitas MMP yaitu transkripsi gen, aktivasi proenzyme dan penghambatan aktivitas. Regulasi transkripsi MMP adalah mekanisme kompleks dan tidak ada faktor tunggal yang bertanggung jawab untuk induksi ekspresi MMP, sitokin seperti TNF- α atau IL-1 dan growth factor (TGF- β). Tingkat regulasi kedua adalah aktivasi proenzim. MMP disintesis sebagai zymogen yaitu residu

sistein dari pro-domain yang menempati pusat aktif sehingga dapat menghapuskan aktivitasnya. Tingkat ketiga regulasi MMP adalah penghambatan aktivitas enzimatik. Aktivitas MMP dapat diblokir oleh inhibitor natural yang ada dalam plasma atau cairan jaringan, seperti *α2-macroglobulin* dan TIMP yang merupakan inhibitor yang lebih spesifik. Selain itu, terdapat pula molekul lainnya yang mengandung domain yang memiliki kesamaan struktur dengan TIMP, misalnya fragmen terminal C dari protein *procollagen C-terminal proteinase enhancer (PCPE)*, domain NC1 kolagen tipe IV, *reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif (RECK)*, dan *Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI2)*. Demikian pula beberapa jalur sinyal tranduksi turut berperan dalam trankripsi MMP misal p38 MAPK, yang dapat berperan meningkakan atau merepresi MMP tergantung jenis sel (Ugalde *et al.*, 2010).

Kemampuan utama MMP adalah mendegradasi ECM, seperti kolagen fibrilar dan non-fibrillar, gelatin, aggrecan, fibronektin, laminin dan elastin. Namun, substrat non-matriks telah dilaporkan dapat dipengaruhi oleh MMP, seperti sitokin, *growth factor*, molekul adhesi, protease lainnya, inhibitor peptidase, faktor pembekuan dan beberapa jenis reseptor. Proses yang diregulasi oleh MMP ini termasuk proliferasi, migrasi, apoptosis, angiogenesis, dan peradangan. MMP memainkan peran penting dalam resorbsi jaringan di beberapa proses fisiologis, seperti siklus endometrium, perkembangan embrio, remodeling tulang, involusi uterus paska melahirkan, dan penyembuhan luka (Ugalde *et al.*, 2010).

Dua metallogelatinase, MMP2 dan MMP9, telah banyak dipelajari perannya dalam migrasi dan re-epithelialisasi, namun belum jelas benar peran proteinase ini. MMP2 (gelatinase A) eksogen menstimulus migrasi epithel pada kultur, kemungkinan dengan memotong laminin 332. MMP2 dan MMP9 dianggap

memfasilitasi pergerakan sel melalui degradasi kolagen tipe IV. Hal ini lebih sesuai untuk pergerakan sel invasif daripada re-epitelialisasi. Fungsi MMP-2 pada reepitelialisasi masih menjadi pertanyaan (Vasala, 2008; Wong, 2008).

2.10 β -Katenin

Interaksi TGF- β 1 dan β -katenin terjadi pada penyembuhan luka. TGF- β 1 tergantung pada ekspresi β -katenin dalam proliferasi, motilitas dan migrasi fibroblas. Hal ini menunjukkan peran sentral molekul ini dalam proses penyembuhan. Aktivasi sinyaling TGF- β 1 secara bersamaan menginduksi aktivitas transkripsional sinyaling Wnt/ β -katenin untuk terjadinya proliferasi.

Stabilisasi ekspresi β -katenin sebaliknya menghilangkan efek Smad3 pada luka.

TGF- β 1 menginduksi aktivasi kontrol *self-renewal* dan deferensiasi *Smad3-dependent* β -katenin. TGF- β 1 dapat memecah komplek β -katenin/cadherin melalui Snail dan meningkatkan migrasi sel (Shao *et al.*, 2011).

β -katenin berhubungan secara langsung dengan cadherin sitoplasma, scaffold / kerangka dan merupakan mediator penting antara cadherin dan aktin sitoskeleton. Kompleks cadherin-katenin merupakan inti yang disertai protein lain seperti protein scaffolding dan regulator sitoskeletal. Secara biokemikal, kompleks cadherin-katenin minimal terdiri dari E-cadherin, β -katenin dan α -catenin yang dapat berikatan secara langsung membentuk *filamentous actin* (F-actin) (Van Buula, 2016).

Jalur Wnt penting dalam proses pertumbuhan termasuk self-renewal, proliferasi sel, difensiasi spesifik dan pemeliharaan stem sel dewasa. Jalur Wnt kanonikal diaktifkan saat glikoprotein Wnt kanonikal mengikat kompleks reseptor membran yang mengandung frizzled (Fzd) and reseptor golongan LRP. Wnt yang sudah berikatan mengaktifkan Disheveled (Dvl), yang kemudian menghambat kompleks kedua yaitu kompleks degradasi β -katenin. Kompleks degradasi β -katenin

terdiri atas axin, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) dan adenomatous polyposis coli (APC). β -katenin difosforilasi oleh GSK3 dan target untuk degradasi proteosomal. Kedua isoform GSK3 yaitu GSK3 α and GSK3 β dapat membentuk komplek dengan APC dan axin memfosforilasi β -katenin. Jika jalur kanonikal Wnt diaktifkan, β -katenin translokasi ke inti sel untuk merangsang ekspresi gen melalui *transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor* (TCF/LEF). β -katenin memediasi ekspresi gen pluripotensi. Selanjutnya diatur oleh co-regulator, TCF lain dan *trinity transcription factors* (Kirby *et al.*, 2012).

2.11 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)

α -SMA (α -smooth muscle actin) banyak terdapat di stress fiber dan adesi fokal, menginduksi reorganisasi sitoskeleton, meningkatkan aktivitas kontraktilitas dan menstimulasi migrasi sel. TGF- β 1 menginduksi gen α -SMA pada tipe sel yang berbeda dan ekspresi dominant-negative Smad3 yang merupakan blok ekspresi α -SMA. TGF- β 1 merupakan mediator kunci induksi α -SMA. Selain itu, aktivitas promoter α -SMA sebagian besar diregulasi aktivitas RhoA. RhoA aktif menyebabkan up-regulasi aktivitas promoter α -SMA, begitu pula sebaliknya penghambatan aktivitas Rho akan menurunkan aktivitas promoter α -SMA (Shao *et al.* 2011).

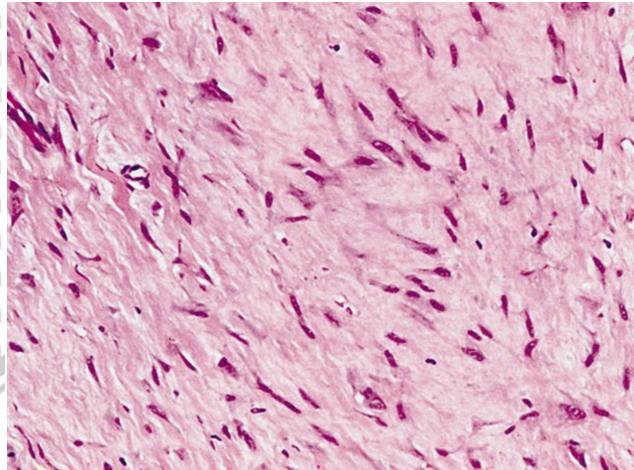
Fibrosis organ parenkim ditandai dengan akumulasi berlebihan protein matrik ekstraselular (ECM) termasuk kolagen fibrillar (terutama kolagen I and III). Activated fibroblasts (fibroblast yang memproduksi kolagen berlebihan) merupakan kunci penentu proses ini, namun karakteristik molekul lain sel ini belum diketahui dengan baik. *Transforming growth factor-* β 1 (TGF- β 1) merangsang dan mengaktifkan fibroblast, dikenal sebagai sitokin profibrogenik yang poten yang memediasi fibrosis pada berbagai organ. Namun Penelitian Sun (2016)

menyebutkan bahwa α SMA bukanlah marker yang konsisten untuk fibroblas yang kontraktile dan banyak kolagen pada percobaan murine model fibrosis organ (Sun, 2016). Fibroblas merupakan sel yang bertanggung jawab untuk sintesa kolagen dan elastin serta organisasi komponen ECM. Komponen-komponen tersebut sangat diperlukan dalam penyembuhan luka. Fibroblas mensintesa *fibronectin-rich* ECM pada saat memasuki hematoma luka. Myofibroblas memiliki morfologi berupa fibroblas dan sel otot polos. Diferensiasi sel ini merupakan proses kontraksi luka melalui pergerakan paralel searah otot polos aktin. Myofibroblas kaya *cytoplasmic microfilament (actin-rich stress fibres)* dan ekspresi *alpha smooth muscle actin (α SMA)*, yang disebut juga *stress fibres*, mengkontraksikan myofibroblas seperti pergerakan otot. Fibroblas tampak pada luka hari 2-3, sedang myofibroblas tampak pada hari 12 saat kontraksi luka hampir 80% lengkap (Porter, 2007).

Penelitian Tawfik *et al.*, (2016) menyebutkan bahwa α -SMA merupakan marker myofibroblas yang paling dapat dipercaya. Myofibroblas tidak hanya berasal dari fibroblas, namun juga sel dari berbagai organ yang disebut fibrosit. Meskipun myofibroblas memiliki peran sangat penting dalam memodulasi penyembuhan luka, remodeling jaringan dan deformasi organ diseluruh tubuh serta telah 30 tahun diketahui peran myofibroblas soket pada pathogenesis kontraksi soket, belum terdapat penelitian yang secara khusus mempelajari hal ini di daerah orbita (Tawfik *et al.*, 2016)

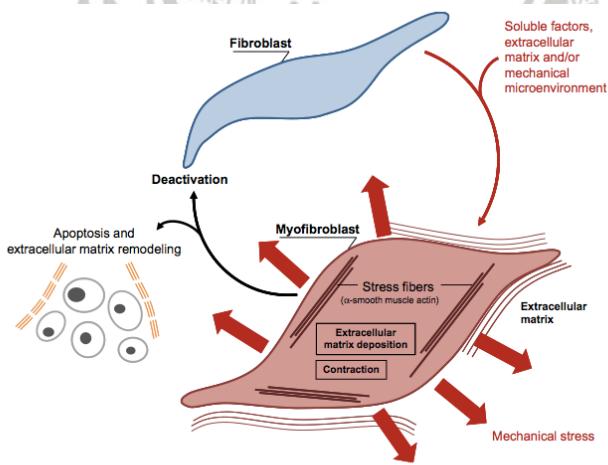
2.12 Morfologi Sel Fibroblas dan Myofibroblas

Sel fibroblas secara histologis merupakan sel dengan ukuran besar, pipih, berbentuk gelendong atau fusiform, inti berbentuk oval dan sitoplasma. Fibroblas memiliki prosesus yang bercabang dan mencolok bila diamati dengan mikroskop



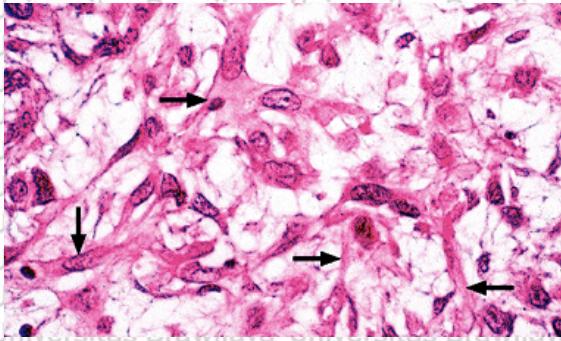
Gambar 2.20. Sel fibroblas. Sel berbentuk gelendong dengan inti oval dan processus bercabang (Arora, 2018)

Myofibroblas merupakan penanda fibrosis dan scarring. Morfologi myofibroblas berbentuk jalinan mikrofilamen yang menonjol pada sitoplasmanya, hal ini membedakan dengan fibroblast normal. Myofibroblas juga memiliki jalinan fibroneksus antara sel dan matrik ekstraselular sekitarnya, yang terkadang tampak seperti sel otot polos (gambar 20.21) (Darby, 2014).



Gambar 2.21. Perubahan fibroblas menjadi myofibroblas dan sebaliknya.

Perubahan menjadi myofibroblas dipengaruhi matrik ekstraseluler dan lingkungan mikro mekanikal. Perubahan menjadi fibroblast dipengaruhi oleh apoptosis dan remodeling matrik ekstraseluler (Darby, 2014).



Gambar 2.22. Sel myofibroblas. Berbentuk stelata, mirip sarang laba-laba dengan perpanjangan sitoplasma dan sitoplasma fibrilar mirip kabel (stress fiber) dengan pewarnaan hematoxylin-phloxine-saffron (Mills, 2007). Smad3 memediasi TGF- β menginduksi kontraksi fibroblast pada kolagen lattice. Regulasi sitokin oleh fibroblast meningkatkan TGF- α , TGF- β and ET-1.

Stimulasi ini mengawali perubahan ekspresi gen yang menyebabkan diferensiasi fibroblast menjadi myofibroblas. Myofibroblas merupakan sel besar yang membrannya berumbai dan memiliki reticulum endoplasmic yang aktif. Myofibroblas dibedakan dengan fibroblast pada pembawa eksositotik yang tinggi dan stress fibers. Pada pemeriksaan mikroskop cahaya dibedakan dengan adanya *smooth muscle actin* pada myofibroblas. Sel Myofibroblas berbentuk stelata, mirip sarang laba-laba dengan perpanjangan sitoplasma dan sitoplasma fibrilar mirip kabel (stress fiber) (gambar 2.22) (Mills, 2007; Dobaczewski et.al., 2010; Baum 2011).

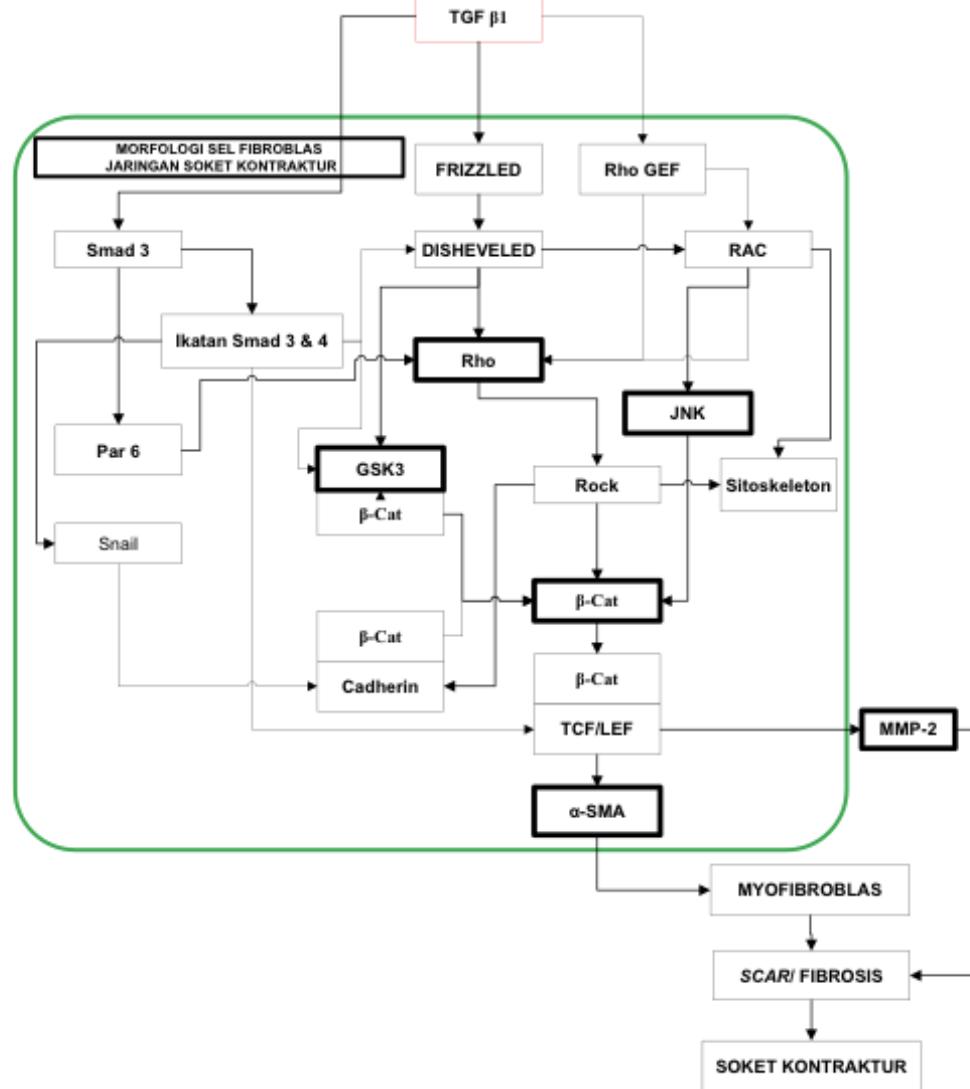
12.13 Subkultur (Passage)

Subkultur atau pasase merupakan pemindahan sel dari media kultur sebelumnya ke media kultur yang baru. Prosedur ini memfasilitasi pembiakan/kultur sel lebih lanjut. Kultur sel ini dapat berupa kultur *adherent* /monolayer (kultur menempel pada dasar media) atau suspensi. Kultur fibroblas merupakan kultur *adherent*. Saat sel pada kultur *adherent* sudah tumbuh menempati seluruh substrat yang ada sehingga tidak ada lagi ruang untuk membelah, proliferasi sel akan mengalami penurunan drastis atau bahkan

berhenti sama sekali. Keadaan ini disebut kondisi konfluen. Maka itu, subkultur juga dapat dipahami sebagai proses pemindahan sel dari kondisi konfluen ke tempat tumbuh yang masih kosong (Masters, 2007). Subkultur dilakukan dengan memisahkan sel dari kultur primer dengan tripsiniasi atau secara mekanis. Kemudian dilakukan penanaman kembali pada media kultur yang baru. Pada subkultur ini dilakukan pemeriksaan pertumbuhan pemberian nutrisi secara periodik dan dapat disubkultur kembali. Waktu antar subkultur berbeda sesuai tipe dan tingkat pertumbuhan sel yang diteliti. Khusus pada sel dengan kultur menempel (adheren), subkultur harus dilakukan saat sel belum tercapai konfluensi. Jika sudah terjadi konfluensi, sel sulit untuk memperbaiki diri (Ricardo, 2008). Jumlah subkultur sel juga perlu diperhatikan. Meskipun belum ada standar baku yang menentukan jumlah minimal atau maksimal dapat dilakukan subkultur, perlu diperhatikan bahwa banyaknya jumlah subkultur dapat mengubah genotype bahkan fenotipe dari sel tersebut akibat semakin jauhnya dari kultur sel awalnya (Masters, 2007).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

█ = parameter yang diperiksa

█ = perlakuan

→ = aktivasi

TGF- β 1 berinteraksi dengan jalur sinyaling lain untuk menginduksi efek biologis melalui berbagai jalur. Terdapat 3 jalur melalui Frizzled (Fzd)/ Disheveled (Dvl) yaitu jalur Rho, rac dan GSK3. TGF- β 1 mengaktifkan sinyaling β -katenin, meningkatkan translokasi β -katenin nuclear dan berinteraksi dengan *transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor* (TCF/LEF) untuk meregulasi ekspresi gen. Perubahan morfologis yang merespon TGF- β 1 berhubungan dengan aktivasi Rho GTPase. β -katenin dan Rho memediasi jalur sinyaling selanjutnya yang dirangsang oleh TGF- β 1. Jalur yang lain dapat diaktifasi secara langsung oleh TGF- β 1. Termasuk komponen jalur MAPK seperti ras, raf, ERK, p38 dan JNK, kaskade phosphatidylinositol-3 kinase serta regulator penghubung cadherin, RhoA dan Rac. Sinyaling FAK yg dinduksi TGF diperlukan untuk aktivasi MEKK dan kemudian JNK. Semua faktor tersebut penting dalam transkripsi gen pro-fibrotik. Pada proses non kanonikal merupakan peran aktivasi Rho GTPase. Rho GTPase juga berperan pada sinyaling kanonikal. Rac1 meregulasi transkripsi oleh β -katenin- dependent selama diferensiasi. Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara TGF- β 1, β -katenin dan Rho GTPase. Hubungan antara β -katenin dan Rho GTPase dapat menyebabkan migrasi dan diferensiasi yang diinduksi oleh TGF- β 1. Kompleks degradasi β -katenin terdiri atas axin, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) dan adenomatous polyposis coli (APC). β -katenin difosforilasi oleh GSK3 untuk degradasi proteosomal. TGF- β 1 dapat menginduksi aktivasi β -katenin dan Rho GTPase, Rho GTPase meregulasi transkripsi β -katenin-dependent dan berinteraksi dengan jalur β -katenin dengan berbagai cara. Selain itu, β -katenin dan Smad yang ada pada sitoplasma nucleus terlibat pada keseluruhan proses. Aktivasi Rho dan inhibisi ROCK menginduksi perlengketan sitoskeleton dan meningkatkan migrasi sel. Dapat dipertimbangkan bahwa β -katenin dan Rho berperan besar dalam

repair sel. Kemungkinan TGF- β 1 dilepaskan dari sel dan matrik ekstraseluler mengaktifkan Rho GTPase untuk memfasilitasi motilitas sel selama awal periode luka. Bersamaan dengan itu hubungan Rho dg Wnt/ β -katenin mengendalikan diferensiasi sel. Saat sel bermigrasi ke tepi luka, TGF- β 1 berperan bersama jalur sinyaling yang lain misalnya MAPK (mitogen-activated protein kinase) melalui Smad untuk mempromosikan diferensiasi dan proliferasi sel. JNK memiliki peranan penting dalam aktivasi faktor transkripsi, stabilisasi mRNA dan proses apoptosis serta proliferasi sel.

Proses penyembuhan luka melibatkan berbagai jenis sel. Kerja sel-sel ini diatur oleh berbagai faktor diantaranya *growth factor*, sitokin, kemokin dan protease khususnya Matrik metaloproteinase (MMP). MMP berperan sejak pada fase proliferasi dan berperan sangat besar pada fase remodeling. Beberapa fungsi MMP ini adalah mendegradasi ECM dan membantu pembentukan pembuluh darah baru dan membantu myofibroblas mengontraktsikan matrik scar.

Pada proses pembentukan scar hipertropik diantaranya terjadi ketidakseimbangan pengaturan MMP dan aktivitas TGF- β yang berlebihan. Interaksi TGF- β 1 dan β -katenin terjadi pada penyembuhan luka. TGF- β 1 tergantung pada ekspresi β -katenin dalam proliferasi, motilitas dan migrasi fibroblas. Hal ini menunjukkan peran sentral molekul ini dalam proses penyembuhan. Aktivasi sinyaling TGF- β 1 secara bersamaan menginduksi aktivitas transkripsional sinyaling Wnt/ β -katenin untuk terjadinya proliferasi. Stabilisasi ekspresi β -katenin sebaliknya menghilangkan efek Smad3 pada luka.

TGF- β 1 menginduksi aktivasi kontrol perbaikan diri dan deferensiasi *Smad3-dependent β -katenin*.

Fibroblas merupakan sel yang bertanggung jawab untuk sintesa kolagen dan elastin serta organisasi komponen ECM. Fibroblas mensintesa *fibronectin-rich* ECM pada saat memasuki hematoma luka. Myofibroblas memiliki morfologi

berupa fibroblas dan sel otot polos. Myofibroblas kaya *cytoplasmic microfilament (actin-rich stress fibres)* dan ekspresi alpha smooth muscle actin (α SMA), yang disebut juga *stress fibres*, mengkontraksi myofibroblas seperti pergerakan otot. Telah lama diketahui peran myofibroblas soket pada patogenesis kontraksi soket, namun belum terdapat penelitian yang secara khusus mempelajari hal ini.

3.2.2 Hipotesis

1. Peningkatan jumlah pasase menurunkan ekspresi α -SMA dan mengubah morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas.
2. Pemberian TGF- β 1 10 ng/mL mempertahankan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase.
3. Peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 meningkatkan ekspresi α -SMA dan mengubah morfologi sel fibroblas menjadi myofibroblas.
4. Peningkatan dosis TGF- β 1 meningkatkan ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.

BAB 4

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan model invitasi.

yang terbagi dalam 2 tahap. Penelitian tahap 1 bertujuan untuk mengetahui

pengaruh TGF- β 1 dan jumlah pasase terhadap ekspresi α -SMA dan perubahan

morfologi sel pada kultur myofibroblas soket kontraktur. Penelitian tahap

bertujuan untuk menganalisa pengaruh TGF- β 1 berbagai dosis terhadap

ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kult

sel myofibroblas soket kontraktur.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 1 pasien setiap tahap (total 2 pasien) di R

dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3, 4 atau 5 yan

dilakukan operasi rekonstruksi soket sesuai indikasi medis. Jaringan fibrosis hasil

diseksi yang biasanya dibuang, disimpan dan dilakukan kultur dan subkultur

sampai memenuhi jumlah sumuran sesuai perhitungan besaran sampai

penelitian berdasarkan rancangan penelitian eksperimental dengan rumus

sebagai berikut:

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

Dimana t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah

replikasi. Pada penelitian ini didapatkan 4 kelompok penelitian, maka jumlah

replikasi yang diperlukan pada tiap kelompok adalah 6 kali. Dengan demikia

diperlukan 24 sumuran untuk setiap tahap penelitian.

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan. Pengambilan sampel di RS dr. Saiful Anwar Malang, sedangkan kultur jaringan dan pemeriksaan parameter dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

- Kriteria Inklusi**
1. Subjek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien setiap tahap (total 2 pasien) di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3 sampai 5 yang diindikasikan operasi rekonstruksi soket.
 2. Kultur tumbuh dengan gambaran sel fibroblas yang berbentuk gelendong (*spindel shaped*), inti sel lonjong dan sitoplasma yang bercabang atau sel myofibroblas yang berbentuk stelata, mirip sarang laba-laba dengan perpanjangan sitoplasma dan sitoplasma fibrilar mirip kabel (stress fiber)

Kriteria Eksklusi

1. Penyebab soket anoftalmia bukan kongenital, trauma kimia, trauma api atau kehilangan jaringan yang banyak.
2. Kultur mengalami kontaminasi jamur (fungi), mikroorganisme lain maupun bahan kimia lainnya.

4.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

Variabel penelitian dan definisi operasional pada bab 5 dan 6 yang membahas tiap tahap penelitian.

4.6 Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan terdapat pada bab 5 dan 6 yang membahas tiap tahap penelitian.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdapat pada bab 5 dan 6 yang membahas tiap tahap penelitian.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis sebagai data kelompok dengan menghitung rata-rata (mean) tiap kelompok dan di uji menggunakan statistik yang sesuai. Semua data ditampilkan sebagai mean \pm standard deviasi ($X \pm SD$) dari masing-masing kelompok dalam bentuk tabel dan grafik.

Sebelum pengujian, normalitas dan homogenitas data diuji terlebih dulu.

Data yang dipergunakan untuk mengambil kesimpulan adalah data kelompok dengan nilai uji normalitas sapiro-wilk bernilai $>0,05$ dan atau homogen dengan nilai uji *homogeneity of variance* $>0,05$.

4.9 Etika Penelitian

Ethical clearance penelitian ini disetujui oleh Komisi Etik RS dr Saiful Anwar Malang.

BAB 5

PENELITIAN TAHAP 1

Pengaruh TGF- β 1 dan Jumlah Pasase terhadap Ekspresi α -SMA dan Perubahan Morfologi Sel pada Kultur Myofibroblas Soket Kontraktur

5.1 Pendahuluan

5.1.1 Latar Belakang

Orbital soket kontraktur merupakan keadaan berkerutnya soket anoftalmia, sehingga tidak dapat dipasang protesa. Kejadian soket kontraktur 7,7% dari seluruh soket anoftalmia (Adhikari et al., 2007). Studi kami di RS dr. Saiful Anwar Malang pada 2007 kejadian soket kontraktur sebesar 32,25% dengan interval terbanyak setelah 5 tahun paska pengambilan mata, yaitu 60% (Lestari, 2008). Hasil penelitian lain di rumah sakit yang sama, operasi rekonstruksi soket dengan pemberian Mitomicin C mencegah rekurensi 50% kasus (Suharyanto, 2012). Pada studi 1 kasus didapatkan soket kontraktur tidak terjadi kembali setelah 7 kali operasi dalam setahun dengan pemberian mitomycin C 0,04% intra operasi dan paska operasi (Dewi, 2012). Pencegahan berulangnya kasus ini dapat dimungkinkan apabila telah diketahui penyebab biomolekular terjadinya Soket kontraktur dan atau berulangnya keadaan tersebut.

Pada soket kontraktur terbentuk jaringan fibrosis dan granulasi akibat iritasi kronis, salah satunya akibat gesekan protesa dengan soket, sehingga menimbulkan respon berupa proses penyembuhan luka kronis (Stroncek et al., 2008; Kurtul, 2014). Terbentuknya scar hipertropik (fibrosis/scarring) yang mendominasi jaringan soket kontraktur merupakan bentuk penyimpangan penyembuhan luka berupa aktivitas fibroblas, pembentukan myofibroblas dan deposisi matrik ekstraselular (Extra Cellular Matrix/ECM) yang berlebihan selama periode penyembuhan luka (Su et al., 2010, Li et al., 2011).

TGF- β memegang peranan terbesar pada setiap fase proses penyembuhan luka mata dengan meningkatkan sekresi *growth factor* yang terlibat pada migrasi sel, proliferasi, deposisi ECM dan pembentukan myofibroblas. Aktivitas *growth factor* yang meningkat tidak hanya menyebabkan peningkatan kecepatan penyembuhan luka, tetapi juga beresiko yang lebih tinggi untuk terbentuknya scar. Oleh karenanya TGF- β masih menjadi target kunci yang potensial untuk intervensi pengobatan proses scarring (Ellis *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Falke *et al.*, 2015; Stahnke *et al.*, 2017).

Saat ini masih belum jelas patogenesis soket kontraktur dan dapat disebabkan banyak faktor. Penelitian tentang fibrosis banyak dilakukan pada jaringan lain, bukan pada soket kontraktur. Penelitian pada soket kontraktur diantaranya oleh Tawfik *et. al.* (2016) Myofibroblas berperan penting dalam memodulasi penyembuhan luka, remodeling jaringan dan deformasi organ diseluruh tubuh. α -SMA merupakan marker myofibroblas yang paling dapat dipercaya. Pada penelitian Kurtul (2014) disebutkan TGF- β 1 merupakan sitokin profibrotik utama dan peningkatan ekspresinya berperan penting dalam deposisi kolagen dan matrik ekstraseluler, penyembuhan luka dan pembentukan scar pada jaringan soket kontraktur.

α -SMA (α -smooth muscle actin) banyak terdapat di stress fiber menginduksi reorganisasi sitoskeleton, meningkatkan aktivitas kontraktilitas dan menstimulasi migrasi sel. TGF- β 1 merupakan mediator kunci induksi α -SMA (Tawfik *et al.*, 2016; Stahnke *et al.*, 2017). Namun Penelitian Sun (2016) menyebutkan bahwa α -SMA bukanlah marker yang konsisten untuk fibroblas yang kontraktil dan banyak kolagen.

Myofibroblas memiliki morfologi berupa fibroblas dan sel otot polos, kaya cytoplasmic microfilament (actin-rich stress fibres) dan ekspresi α -SMA. Stress

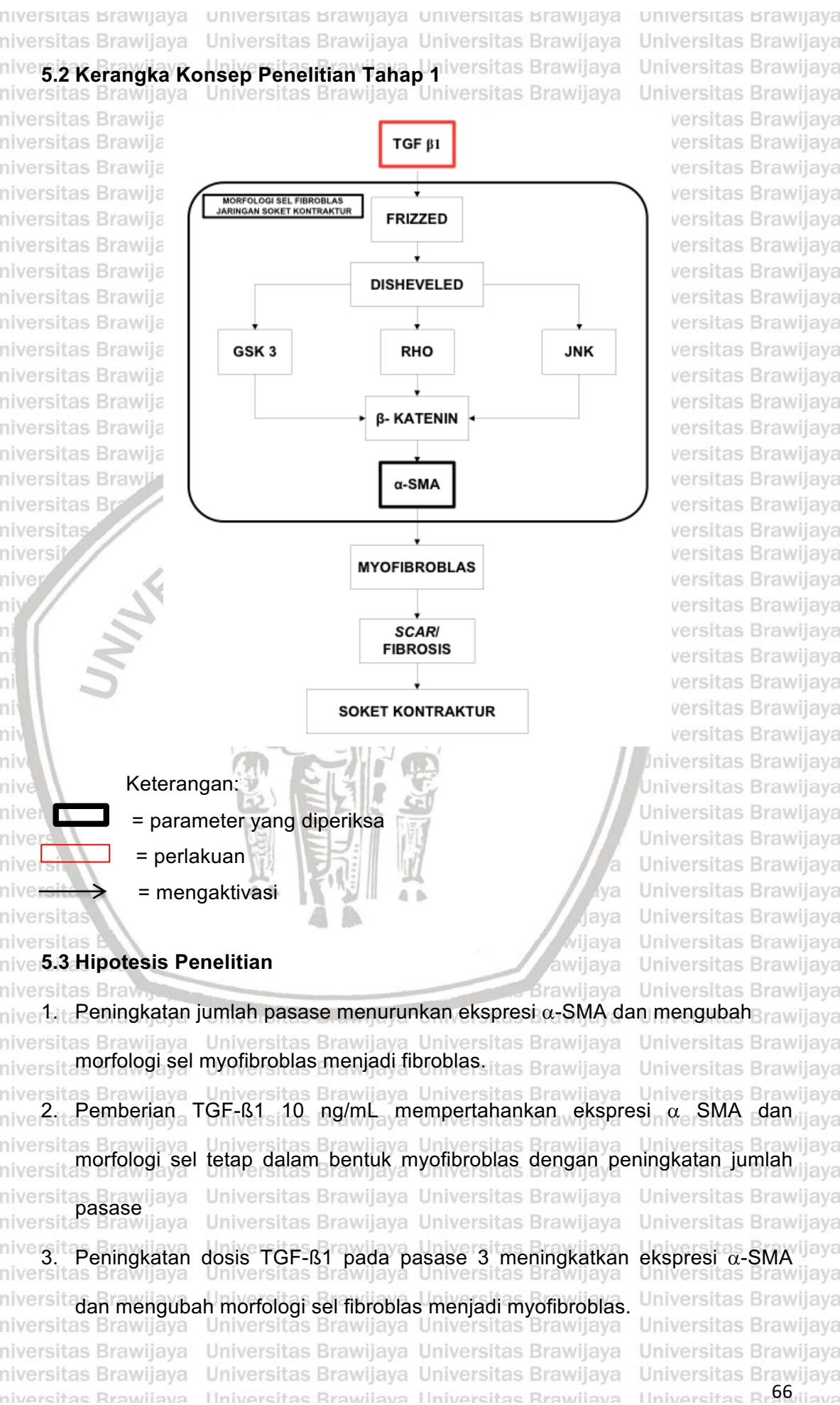
fibres mengkontraksikan myofibroblas seperti pergerakan otot. Fibroblas tampak pada luka hari 2-3, sedang myofibroblas tampak pada hari 12 saat kontraksi luka hampir 80% lengkap (Tawfik et al., 2016; Stahnke et al., 2017). Metode kultur dan subkultur merupakan teknik untuk mempertahankan kehidupan jaringan dan memperbanyak sel secara *in vitro*. Media kultur merupakan media tumbuh tanpa adanya *growth factor* (TGF- β 1) seperti pada organnya (*in vivo*), sehingga diharapkan sel tumbuh tanpa pengaruh TGF- β 1.

5.1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimakah pengaruh peningkatan jumlah pasase terhadap ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas?
2. Bagaimakah pengaruh pemberian TGF- β 1 10 ng/mL dalam mempertahankan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase?
3. Bagaimakah pengaruh peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 terhadap peningkatan ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel fibroblas menjadi myofibroblas?

5.1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh peningkatan jumlah pasase terhadap ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas.
2. Mengetahui pengaruh pemberian TGF- β 1 10 ng/mL dalam mempertahankan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase.
3. Mengetahui pengaruh peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 terhadap peningkatan ekspresi α -SMA dan perubahan morfologi sel fibroblas menjadi myofibroblas.



awijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya universitas Brawijaya

awijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

5.4 Desain Penelitian

5.4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Desain penelitian ini adalah eksperimental dengan kontrol, dilaksanakan selama 3 bulan (Oktober sampai Desember 2017). Pengambilan sampel di RS dr. Saiful Anwar Malang, sedangkan kultur jaringan dan pemeriksaan parameter dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

5.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 1 pasien dengan soket kontraktur derajat 4 yang dilakukan operasi rekonstruksi soket sesuai indikasi medis. Jaringan fibrosis hasil diseksi yang seharusnya dibuang kemudian disimpan untuk dilakukan kultur dan subkultur sampai memenuhi jumlah sumuran. Ekspresi α -SMA diukur pada subkultur/pasase I, II, III tanpa dan dengan pemberian TGF- β 1 10ng/mL serta pada subkultur III dengan pemberian TGF- β 1 dosis 2,5 ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL dan 20ng/mL. Perhitungan besar sampel eksperimental adalah sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq$$

Dimana t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah replikasi. Pada penelitian ini didapatkan 5 kelompok penelitian, maka jumlah replikasi yang diperlukan pada tiap kelompok adalah 5 kali. Dengan demikian pada tahap ini diperlukan sebanyak 25 sumuran.

5.4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

1. Subjek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 4 yang diindikasikan operasi rekonstruksi soket.

2. Kultur tumbuh dengan gambaran sel fibroblas yang berbentuk

gelendong (*spindle shaped*). inti sel lonjong dan sitoplasma yang

bercabang atau sel myofibroblas yang berbentuk stelata mirip sarang.

Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
kobel (stress fiber)

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Kriteria Eksklusi

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Brawijaya University | Universitas Brawijaya | Universitas Brawijaya

2. Kultur mengalami kontaminasi jamur (fungi), mikroorganisme lain,

maupun bahan kimia lainnya.

Universitas Brawijaya

5.4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: TGF- β 1
 2. Variabel tergantung: kadar α SMA dan morfologi sel

5.4.5 Definisi Operasional

1. Soket kontraktur adalah kontraktur pada bagian forniks kelopak mata atas maupun bawah atau pada keduanya sekaligus, disertai pembentukan siktatrik yang menyebabkan protesa tidak terpasang dengan baik, bahkan sama sekali tidak dapat menggunakannya.
 2. Kultur sel myofibroblas manusia adalah biakan sel – sel myofibroblas yang didapatkan dari jaringan tenon manusia yang diperoleh dari operasi rekonstruksi soket kontraktur di kamar operasi RSSA dan ditanam pada media kultur.
 3. TGF- β 1 (Transforming growth factor- β) adalah *growth factor* yang berperan penting dalam regulasi respon imun, proliferasi, diferensiasi dan

- migrasi sel, proses penyembuhan luka, hemostasis vaskular dan fibrosis, diinduksi dengan Recombinant human TGF- β 1 protein (Abcam: Ab50036)
4. α -SMA (*alpha smooth muscle actin*) adalah protein yang meningkatkan kontraktilitas sel dan membentuk fenotip myofibroblas. Dihitung kadarnya dengan Anti Alpha Smooth Muscle Actin (abcam, nomor katalog Ab7817) dan diamati dengan gambaran Fluoresen, didapatkan ekspresi α -SMA berwarna merah dengan pembesaran 400 \times , kekuatan eksitasi 0.5% dan kekuatan 850 *laser scanning confocal microscope* (CLSM FV1000, Olympus Corp., Waltham, MA). Gambaran fluoresen konfokal dianalisa dengan software Olympus Fluoview ver.4.2a. Ekspresi α -SMA diukur dalam arbitrary unit (AU).
5. Morfologi sel adalah bentuk sel fibroblas dan atau myofibroblas yang diobservasi secara morfologi dengan pembesaran 100 \times dg inverted Olympus IX 71 dan pembesaran 400x dg CLSM FV1000.

5.4.6 Alat dan Bahan Penelitian

Alat:

1. Skalpel 11.0
2. Jarum 18G, 21G, dan 23G
3. Sentrifugator
4. Inkubator
5. Plate 24 sumuran
6. Sarung tangan

Bahan Penelitian:

Kultur sel myofibroblas soket kontraktur (*Unpublished data*. Wulandari, 2012;

Unpublished data. Rahmaniah, 2015):

1. Jaringan soket kontraktur pasien yang dilakukan operasi rekonstruksi

2. DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)

3. Serum fetal sapi (*Fetal Bovine Serum* atau FBS)

4. Penicillin-Streptomycin (Gibco-Carlsbad, CA)

5. Trypsin 0,05%

6. Phosphate-buffered saline (PBS)

Perlakuan:

Kultur sel myofibroblas diberikan perlakuan TGF- β 1 pada:

1. Pasase 1, 2 dan 3 dengan dosis TGF- β 1 10ng/ml

2. Pasase 3 dengan dosis 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 7,5 ng/ml dan 10 ng/ml

3. Inkubasi sel pada suhu 37 °C dan 5% CO₂ selama 24 jam

4. Medium diaspirasi dengan hati – hati dan sel dicuci dengan 1 ml PBS sebanyak tiga kali

5.4.7 Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel dan Kultur

Jaringan tenon fibrosis dari soket kontraktur pasien didapatkan dari hasil

diseksi jaringan fibrosis saat operasi rekonstruksi soket sesuai indikasi medis.

Jaringan fibrosis hasil diseksi yang biasanya dibuang, disimpan dan dilakukan

kultur dan subkultur. Tindakan ini memenuhi standar deklarasi Helsinki dan

disetujui oleh komisi etik RS Saiful Anwar Malang. Pengambilan sampel dan

kultur adalah sebagai berikut:

1. Jaringan tenon dipotong – potong sebesar 1 mm³ menggunakan pisau

bedah ukuran 11.

2. Sel diletakkan pada media kultur isi 12 dengan 5 ml DMEM media kultur, 50

U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin dan 10% FBS.

3. Sel kultur disimpan pada suhu 37°C pada inkubator yang dijaga kelembapannya dengan 5% CO₂.
4. Media diganti 3 kali seminggu sampai dengan jifibroblas/myofibroblas tumbuh dengan baik dan konfluen.
5. Jika fibroblas/myofibroblas telah tumbuh konfluen, dilakukan tripsiniasi dengan larutan 0.25% trypsin/EDTA dalam phosphate buffered saline (PBS), kemudian dilakukan sub kultur dengan flasks 25 cm².
6. Sub kultur dilakukan tiga kali sebelum dilakukan perlakuan, selama 3 minggu.
7. Jika tidak langsung dilakukan pemeriksaan, maka sel disimpan pada -80°C

Pemeriksaan ekspresi α -Sma menggunakan imunohistokimia dan mikroskop konfokal

Bahan:

1. Paraformaldehyde 3%
2. Phosphate-buffered saline (PBS)
3. Triton X-100
4. 3% BSA
5. Antibodi primer (1/400 dalam 1x TBS)
6. Sekunder antibodi Alexa Fluor®633-conjugated Goat anti-mouse IgG polyclonal (1/500)

Prosedur:

1. Fixasi sampel dengan Paraformaldehyde 3% pada PBS, permeabilisasi dengan 0.1% Triton X-100 dan di blok dengan 3% BSA selama 30 menit pada 25 °C.
2. Sampel diinkubasi dengan antibodi primer (1/400 dalam 1x TBS) selama 3

jam pada 25 ° C.

3. Diberikan sekunder antibodi Alexa Fluor®633-conjugated Goat anti-mouse IgG polyclonal (1/500).

4. Gambar Fluorescence α-SMA myofibroblasts didapatkan sebagai warna merah using 400x magnification, 0.5% kekuatan eksitasi dan gain 850 pada laser scanning confocal microscope (CLSM FV1000, Olympus Corp., Waltham, MA).

5. Gambar konfokal dianalisa dengan perangkat lunak Olympus Fluoview ver.4.2a. ekspresi α-SMA dihitung dalam satuan arbitrary unit (AU).

Pemeriksaan morfologi sel fibroblas dan atau myofibroblas.

Bahan:

1. Paraformaldehyde 3% pada PBS
2. Glycine 1%/ BSA 1% pada PBS
3. Slide kaca dengan Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL).

Prosedur:

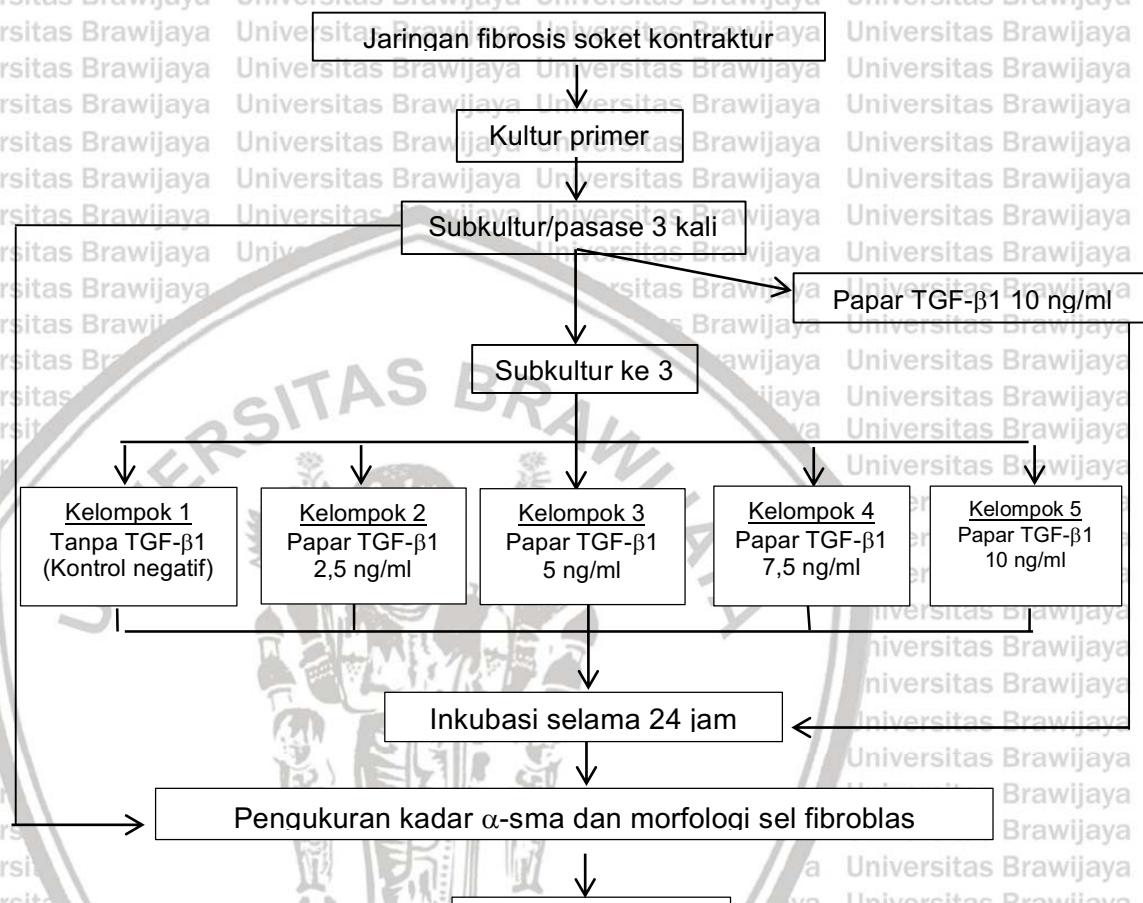
1. Sampel difiksasi selama 30 menit pada suhu ruangan dengan Paraformaldehyde 3% pada PBS
2. Diblok dengan Glycine 1%/ BSA 1% pada PBS selama 30 menit
3. Morfologi sel diamati dengan pembesaran 100x dengan mikroskop inverted Olympus IX 71 dan pembesaran 400x dengan CLSM FV1000.

5.4.8 Analisis Data

Data yang dipergunakan untuk mengambil kesimpulan adalah data kelompok dengan nilai uji normalitas kolmogorov-smirnov bernilai >0,05 dan

untuk uji homogenitas menggunakan uji levene $>0,05$. Selanjutnya dianalisa dengan uji One way Anova dan tukey dengan kebermaknaan $< 0,05$.

5.4.9 Alur Penelitian Tahap 1



5.5 Hasil Penelitian dan Pembahasan

5.5.1 Efek jumlah pasase pada ekspresi α-SMA

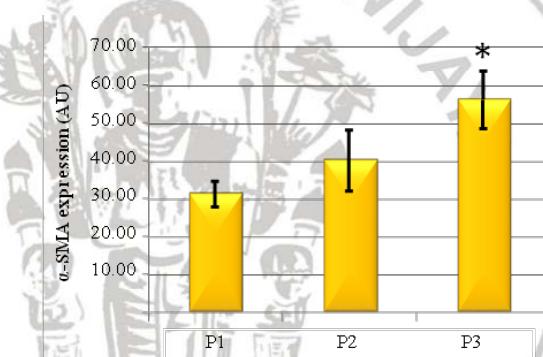
Pada penelitian ini dilakukan kultur dan subkultur/pasase jaringan dari pasien dengan soket kontraktur orbita derajat 4. Pada pemeriksaan tingkat ekspresi α-SMA dilakukan 5 kali foto lapang pandang untuk setiap sumuran. Pemeriksaan dilakukan pada kelompok pasase 1,2,3 dengan dan tanpa penambahan TGF-β1 10ng/ml, serta pada pasase 3 dengan penambahan TGF-β1 10ng/ml.

$\beta 1$ 2,5, 5, 7,5 dan 10ng/ml. Pengamatan dan interpretasi ekspresi α -SMA dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) Olympus type FV1000 didapatkan hasil pada tabel 5.1 dan 5.2.

Tabel 5.1 Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase (P) 1,2,3

Lapang Pandang	P 1	P2	P3
1	32,91	47,16	56,13
2	31,50	31,43	69,15
3	27,32	47,19	49,28
4	29,20	31,60	54,21
5	36,15	44,31	53,10
Mean	31,42	40,34	56,37
SD	3,40	8,14	7,57

Ekspresi α -SMA meningkat dengan peningkatan jumlah pasase (P), dengan nilai $31,42 \pm 3,4$, $40,34 \pm 8,14$ dan $56,37 \pm 7,57$ arbitrary unit (gambar 5.1).



Gambar 5.1. Tingkat ekspresi α -SMA meningkat pada peningkatan pasase (P1, P2, P3) tanpa TGF- $\beta 1$. *menandakan berbeda signifikan

Penelitian ini menunjukkan bahwa pasase secara bermakna meningkatkan tingkat ekspresi α -SMA kultur primer sel myofibroblas jaringan soket kontraktur orbital. Hasil serupa dilaporkan oleh Kinner (2001) bahwa tingkat ekspresi α -SMA meningkat mengikuti jumlah pasase yang dilakukan. Salah satu faktor utama perubahan fisiologis dari fibroblas menjadi myofibroblas adalah ketegangan mekanik (Kinner, 2001). Menurut Wakatsuki *et.al.* (2000) ada peningkatan progresif dalam rigititas matriks selama jaringan mengalami ketegangan, termasuk dalam penelitian ini selama proses pasase terjadi peningkatan ketegangan jaringan (Wakatsuki *et.al.*, 2000).

TGF- β 1 merupakan mediator kunci induksi α -SMA (Tawfik *et al.*, 2016; Stahnke *et al.*, 2017). Namun Penelitian Sun (2016) menyebutkan bahwa α -SMA bukanlah marker yang konsisten untuk fibroblas yang diaktifasi oleh TGF- β atau produksi kolagen.

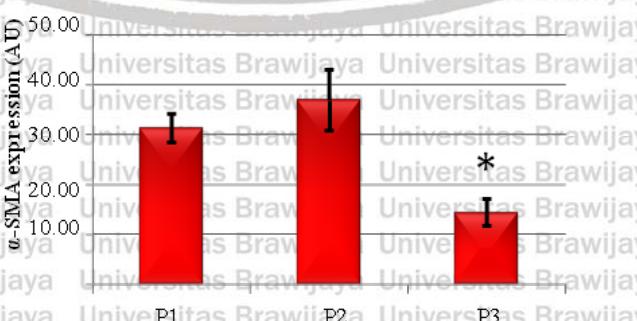
5.5.2 Efek Penambahan TGF- β 1 10 ng/mL pada pasase berbeda terhadap ekspresi α -SMA

Data penelitian Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase (P) 1,2,3 dengan TGF- β 10ng/mL dapat dilihat pada table 5.2 berikut:

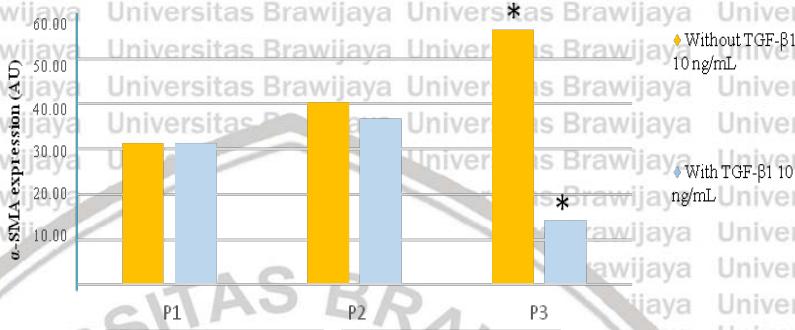
Tabel 5.2 Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase (P) 1,2,3 dengan TGF- β 10ng/mL

Lapang Pandang	P 1	P2	P3
1	32,21	36,14	13,81
2	31,39	35,24	18,77
3	32,52	46,49	11,45
4	26,23	36,58	14,25
5	33,83	29,61	13,18
Mean	31,24	36,81	14,29
SD	2,93	6,09	2,72

Penambahan TGF- β 1 10 ng/mL menurunkan tingkat ekspresi α -SMA pada pasase 3 ($p=0.000$). Tingkat ekspresi α -SMA pada setiap kelompok pasase 1,2,3 sebesar 31.24 ± 2.93 , 36.81 ± 6.09 dan 14.29 ± 2.72 arbitrary unit (gambar 5.2).



Gambar 5.2. Tingkat ekspresi α -SMA pada pasase kultur sel yang berbeda (P1, P2, P3) dengan penambahan TGF- β 1 10ng/ml. *menandakan berbeda signifikan dengan P1 ($p=0.000$).



Gambar 5.3. Efek pasase dan penambahan TGF- β 1. Efek bermakna tampak pada pasase 3 tanpa dan dengan penambahan TGF- β 1 10 ng/mL.

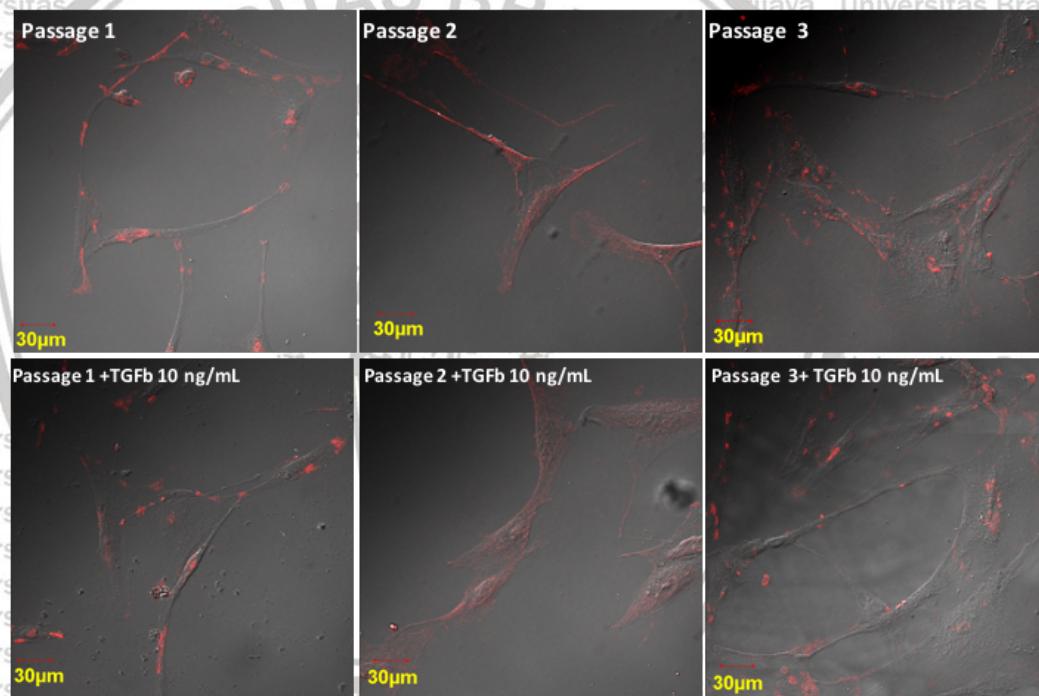
Hipotesis bahwa pemberian TGF- β 1 dengan kadar 10ng/mL pada tiap subkultur diharapkan dapat mempertahankan tingkat ekspresi α -SMA yang sama pada tiap kelompoknya. Dosis TGF- β 1 sebesar 10ng/mL mampu menunjukkan respon yang baik terhadap diferensiasi fibroblas yang diteliti (Serpero *et.al.*, 2006, Caraci *et.al.*, 2008, dan Dodi *et.al.*, 2015). Namun pada penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian TGF- β 1 dosis yang sama pada tingkatan subkultur yang berbeda memberikan angka tingkat ekspresi α -SMA yang berbeda pula (Gambar 5.3). Perbedaan ini semakin menunjukkan subkultur lebih berperan dalam meregulasi perubahan (peningkatan) tingkat ekspresi α -SMA.

Pada penelitian ini pula ternyata subkultur III menunjukkan respon yang berbeda terhadap pemberian TGF- β 1 jika dibandingkan dengan subkultur I dan II. Meskipun pada penelitian-penelitian sebelumnya didapatkan bahwa TGF- β merupakan *growth factor* utama dalam diferensiasi fibroblas menjadi

myofibroblas (Walker *et.al.*, 2004, dan Untergasser *et.al.*, 2005), melalui penelitian ini dapat dilihat minimnya peran TGF- β terhadap perubahan tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan soket kontraktur orbita.

5.5.3 Morfologi Sel Myofibroblas pada perbedaan pasase dan penambahan TGF- β 1

Hasil penelitian ini secara mikroskopis menggambarkan perbedaan pasase, baik tanpa maupun dengan penambahan TGF- β 1, tidak mengubah morfologi sel myofibroblas (gambar 5.4).



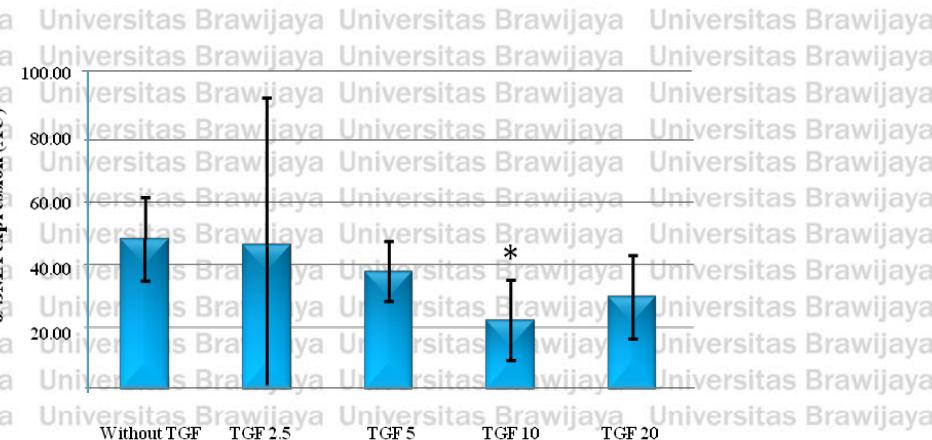
Gambar 5.4. Hasil pengamatan melalui Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus type FV1000 menggunakan imunfluorescence untuk α -SMA (merah) dan emboss konfokal untuk melihat morfologi sel. Secara mikroskopis menggambarkan perbedaan pasase, baik tanpa maupun dengan penambahan TGF- β 1, tidak mengubah morfologi sel myofibroblas.

Penelitian ini menunjukkan bahwa pasase tanpa penambahan TGF- β 1, sebagai faktor pro-fibrotik, memberikan hasil myofibroblas memiliki morfologis

yang sama, sedangkan tingkat α -SMA meningkat. Kemungkinan, proses pasase sendiri menginduksi stres respon, yang dapat meningkatkan produksi TGF- β 1 endogen, kemudian menginduksi ekspresi α -SMA, bahkan tanpa TGF- β 1 eksogen (Hinz B, 2015). Menurut Manapov et.al. (2005) melakukan penelitian pada myofibroblas dari pankreas. Dari penelitian ini ditemukan bahwa myofibroblas dari jaringan pankreas yang mengalami *wound healing* tersebut memiliki sifat sementara dan lokalisasi intraseluler p21^{Cip1/WAF1} berperan dalam konversi fenotip sel ini menjadi fibroblas, pada perlakuan kultur dan percobaan (Manapov, 2005). Sedangkan selama proses penyembuhan luka fisiologis, myofibroblas mengalami apoptosis (Darby et.al., 2014; Tomasek et.al., 2002; O'connor et. al., 2016; Negmadjanov et al., 2016)

5.5.4 Efek Penambahan TGF- β 1 berbagai dosis pada pasase 3 terhadap ekspresi α -SMA

Efek Penambahan TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi α -SMA diteliti pada pasase 3 kultur myofibroblas. Hasil penelitian menunjukkan tingkat ekspresi α -SMA turun secara bermakna pada dosis TGF- β 1 10 ng/mL dibanding tanpa pemberian TGF- β 1 ($p=0.000$). Tingkat ekspresi α -SMA sebesar $48,34 \pm 13,36$, $46,45 \pm 47,04$, $38,07 \pm 9,54$, $22,37 \pm 12,86$ dan $29,80 \pm 13,33$ berturut-turut untuk dosis TGF- β 1 0, 2,5, 5, 10 dan 20 ng/mL (gambar 5.5).



Gambar 5.5. Efek Penambahan TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi α -SMA diteliti pada pasase 3 kultur myofibroblas. Tingkat ekspresi α -SMA turun secara bermakna pada dosis TGF- β 1 10 ng/mL (* berarti $p < 0.05$).

Penambahan TGF- β 1 eksogen pada pasase 3 menghasilkan α -SMA yang rendah secara bermakna. Dalam hal ini, penelitian lain melaporkan bahwa

TGF- β 1 dapat mengaktifkan reseptor TGF- β 1, namun, TGF- β 1 ini tidak menginduksi ekspresi α -SMA, namun mengaktifkan focal adhesion kinase (FAK).

Selanjutnya, FAK mengikat integrin, fibronektin dan kolagen yang semuanya memiliki peran sebagai reseptor adhesi sel dalam diferensiasi myofibroblas (Thannickal, 2003). Studi lain juga melaporkan bahwa TGF- β 1 tidak selalu menginduksi ekspresi α -SMA. Hyaluronan sintetis (HA) menghambat diferensiasi myofibroblas tanpa menurunkan ekspresi reseptor TGF- β 1 (Chen, 2012).

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengklarifikasi apakah aktivasi FAK menyebabkan degradasi α -SMA dan apoptosis myofibroblas, atau terdapat jalur lain yang menyebabkan TGF- β 1 menurunkan α -SMA.

Menurut Walker *et.al.* (2004) ditemukan bahwa TGF- β 1 konsentrasi tinggi mampu meningkatkan jumlah apoptosis sel katup jantung *in vitro*. Hal ini dapat menjadi salah satu penjelasan penurunan kadar α -SMA pada kelompok konsentrasi TGF- β 1 yang semakin tinggi.

Pada penelitian ini sesuai hipotesa, perlakuan diberikan pada pasase 3 dan morfologi sel telah berubah menjadi bentuk fibroblas, dan diharapkan akan berubah menjadi bentuk myofibroblas dengan perlakuan peningkatan dosis TGF- β 1. Namun karena hasil penelitian dengan perlakuan pasase memberikan hasil pada pasase 3 morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas, maka pada penelitian dengan perlakuan peningkatan dosis TGF- β 1, dilakukan pada sel dalam bentuk morfologi myofibroblas. Hasil penelitian menunjukkan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan dosis TGF- β 1. Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak ada pemeriksaan populasi sel sebelum dan sesudah pengobatan, identifikasi inti sel dan indikator apoptosis. Dalam penelitian lebih lanjut perlu untuk mengamati apakah aktivasi FAK menyebabkan degradasi α -SMA.

5.6 Kesimpulan dan Saran

5.6.1 Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian tahap 1 ini adalah:

1. Peningkatan jumlah pasase meningkatkan ekspresi α -SMA dan tidak mengubah morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas.
2. Pemberian TGF- β 1 10 ng/mL tidak mampu mempertahankan; bahkan menurunkan ekspresi α -SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase
3. Peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 menurunkan ekspresi α -SMA dan tidak mengubah morfologi sel myofibroblas.
 - Morfologi sel myofibroblas tidak dapat berubah kembali menjadi sel fibroblas.

5.6.2 Saran

Percobaan *in vitro* untuk mempelajari myofibroblas dari jaringan soket β 1 jaringan tersebut sebelum perlakuan.



BAB 6**PENELITIAN TAHAP 2****Pengaruh TGF- β 1 Berbagai Dosis terhadap Ekspresi RHO GTPase, GSK3,****JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada Kultur Sel Myofibroblas****Soket Kontraktur****6.1 Pendahuluan****6.1.1 Latar Belakang**

TGF- β 1 merupakan sitokin profibrotik utama dan peningkatan kadarnya

berperan penting dalam deposisi kolagen dan matriks ekstraseluler, penyembuhan

luka dan pembentukan scar pada jaringan soket kontraktur (Kurtul, 2014). TGF-

β 1 memegang peranan terbesar pada setiap fase proses penyembuhan luka

mata dengan meningkatkan sekresi *growth factor* yang terlibat pada migrasi sel,

proliferasi, deposisi ECM dan pembentukan myofibroblas. Oleh karenanya TGF-

β 1 masih menjadi target kunci yang potensial untuk intervensi pengobatan

proses scarring.

Pada diferensiasi sel jaringan pulpa, sinyal TGF- β 1 dapat dilanjutkan oleh

p38 mitogen-activated protein kinase. Namun sampai saat ini mekanisme

molekuler yang menjadi pencetus dan yang meregulasinya masih belum jelas.

TGF- β 1 berinteraksi dengan jalur sinyaling lain seperti Wnt/ β -katenin dan Rho

untuk menginduksi efek biologis yang lain. Hubungan antara β -katenin dan Rho

GTPase dapat menyebabkan migrasi dan diferensiasi yang diinduksi oleh TGF-

β 1. β -katenin difosforilasi oleh GSK3 untuk degradasi proteosomal (Shao et al.

2011).

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) berpengaruh pada translokasi

inti sel dan meregulasi sinyaling TGF- β 1. Jun N-Terminal Kinase (JNK) termasuk

komponen jalur MAPK. TGF- β 1 menginduksi proses yang berbeda dan terjadi

respon yang tumpang tindih pada organ yang berbeda (Pohlers *et al.*, 2009). Myofibroblas berperan penting dalam memodulasi penyembuhan luka, remodeling jaringan dan deformasi organ diseluruh tubuh. α -SMA merupakan marker myofibroblas yang paling dapat dipercaya. Telah lama diketahui peran myofibroblas pada patogenesis kontraksi soket, namun belum terdapat penelitian yang khusus mempelajari hal ini di daerah orbita (Tawfik *et al.*, 2016). Soket kontraktur dapat disebabkan oleh banyak faktor. TGF- β 1 sebagai sitokin profibrotik utama merupakan salah satu faktor penyebab dan dapat pula dipengaruhi oleh faktor atau protein yang lain. Namun untuk membatasinya pada penelitian ini penulis memfokuskan pada TGF- β 1 dan beberapa protein yang berhubungan dan merupakan sinyaling lanjutan dari TGF- β 1 sampai terjadinya fibrosis soket kontraktur.

Kondisi tersebut mendorong penulis untuk mengeksplorasi pengaruh TGF- β 1 terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas orbital soket kontraktur.

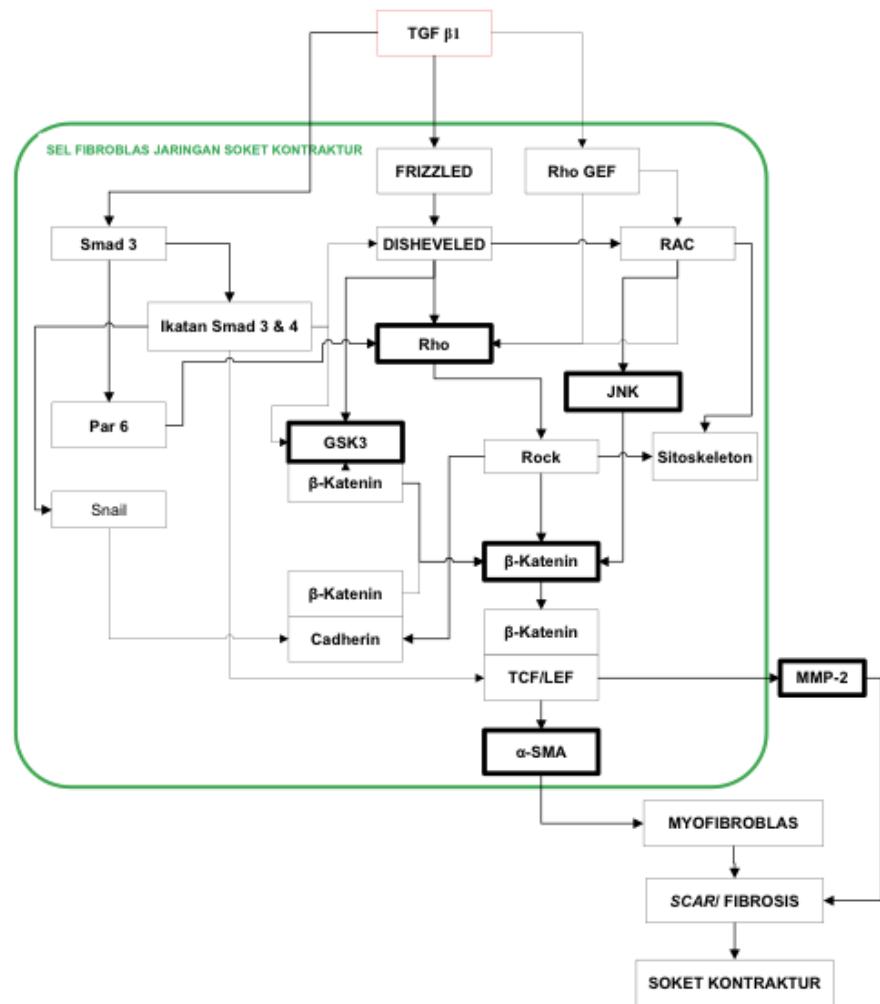
6.1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah pengaruh TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur?

6.1.3 Tujuan Penelitian

Menganalisa pengaruh TGF- β 1 berbagai dosis terhadap ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.

6.2 Kerangka Konsep Penelitian Tahap 2



Keterangan:

= parameter yang diperiksa

= perlakuan

6.3 Hipotesis Penelitian

Peningkatan dosis TGF- β 1 meningkatkan ekspresi RHO GTPase, GSK3,

JNK, MMP-2, β -katenin dan α -SMA pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.

6.4 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium, dimana peneliti akan melihat perubahan parameter-parameter yang diukur selama pemberian TGF- β 1 berbagai dosis pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur. Hasil yang didapatkan adalah ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma.

6.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan. Pengambilan sampel di RS dr. Saiful Anwar Malang, sedangkan kultur jaringan dan pemeriksaan parameter dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

6.6 Sampel Penelitian

Sampel penelitian tahap ini adalah 1 pasien di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3, 4 atau 5 yang dilakukan operasi rekonstruksi soket sesuai indikasi medis. Jaringan fibrosis hasil diseksi yang biasanya dibuang, disimpan dan dilakukan kultur dan subkultur/pasarse. Perhitungan besar sampel eksperimental adalah sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq$$

Dimana t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah replikasi. Pada penelitian ini didapatkan 4 kelompok penelitian, maka jumlah replikasi yang diperlukan pada tiap kelompok adalah 6 kali. Dengan demikian pada tahap ini diperlukan sebanyak 24 sumuran.

Kultur sel dibagi dalam 4 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 6 sampel untuk setiap parameter:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif, diberikan pelarut TGF- β 1 dan diukur ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma

2. Kelompok 3: diberikan TGF- β 1 dosis 10 ng/ml dan diukur ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma
3. Kelompok 4: diberikan TGF- β 1 dosis 20 ng/ml dan diukur ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma
4. Kelompok 5: diberikan TGF- β 1 dosis 40 ng/ml dan diukur ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma

6.7 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

1. Subjek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien setiap tahap di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3, 4 atau 5 yang diindikasikan operasi rekonstruksi soket.
2. Kultur tumbuh dengan gambaran sel myofibroblas yang berbentuk gelendong (*spindel shaped*), inti sel lonjong dan sitoplasma yang bercabang.

Kriteria Eksklusi

1. Penyebab soket anoftalmia bukan kongenital, trauma kimia, trauma api atau kehilangan jaringan yang banyak.
2. Kultur mengalami kontaminasi jamur (fungi), mikroorganisme lain, maupun bahan kimia lainnya.

6.8 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas adalah TGF- β 1
2. Variabel tergantung adalah ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma

6.9 Definisi Operasional

Parameter yang akan diukur dalam penelitian ini adalah ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β -katenin dan α -sma yang akan dilihat ekspresinya setelah pemberian TGF- β 1 berbagai dosis pada kultur sel myofibroblas. Jaringan diambil saat operasi rekonstruksi yang sudah menjadi prosedur tetap (protap) di rumah sakit sehingga peneliti bisa memanfaatkan jaringan yang didapat tanpa menambah prosedur pengambilan jaringan diluar protap.

Definisi Operasional Penelitian

1. Soket kontraktur adalah kontraktur pada bagian forniks kelopak mata atas maupun bawah atau pada keduanya sekaligus, disertai pembentukan sikatrik yang menyebabkan protesa tidak terpasang dengan baik, bahkan sama sekali tidak dapat menggunakannya.
2. Kultur sel myofibroblas adalah biakan sel – sel myofibroblas yang didapatkan dari jaringan fibrosis soket kontraktur yang diperoleh dari operasi rekonstruksi soket di kamar operasi RSSA dan ditanam pada media kultur.
3. TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1) adalah *growth factor* yang berperan penting dalam regulasi respon imun, proliferasi, diferensiasi dan migrasi sel, proses penyembuhan luka, hemostasis vaskular dan fibrosis.
4. RHO GTPase adalah protein yang sangat penting dalam regulasi pembentukan aktin sitoskeleton, motilitas sel, proliferasi dan pertahanan diri. Dihitung ekspresinya dengan metode Elisa. Dihitung dalam ng/ml.
5. GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) adalah protein kinase serine, merupakan jalur regulatori utama sinyaling ekstraseluler dan intraseluler untuk pertumbuhan, pertahanan, regenerasi, kematian sel dan inflamasi. Dihitung ekspresinya dengan metode Elisa. Dihitung dalam μ g/ml.

6. JNK (Jun N-terminal kinase) adalah anggota mitogen-activated protein kinase (MAPK), merupakan protein kinase serine/threonin yang memfosforilasi c-Jun, salah satu komponen faktor transkripsi activator protein-1 (AP-1). Dihitung ekspresinya dengan metode Elisa. Dihitung dalam ng/ml.
7. MMP-2 (Matrik metaloproteinase-2/gelatinase-A) adalah enzim endopeptidase yang dapat mendegradasi protein ECM, disekresikan ekstraselular diproduksi terutama oleh fibroblas dan disekresikan dalam bentuk inaktif, yang kemudian dipecah menjadi bentuk aktif. Dihitung ekspresinya dengan metode Elisa. Dihitung dalam ng/ml.
8. β -katenin adalah protein ekstraselular diproduksi terutama oleh fibroblas dan disekresikan merupakan mediator penting dalam proliferasi, motilitas dan migrasi fibroblast serta antara cadherin dan aktin sitoskeleton. Dihitung ekspresinya dengan metode elisa. Dihitung dalam ng/ml.
9. α -SMA (*alpha smooth muscle actin*) adalah protein yang meningkatkan kontraktilitas sel dan membentuk fenotip myofibroblas. Dihitung ekspresinya dengan metode imunohistokimia dan pengamatan mikroskop konfokal. Dihitung dalam satuan arbitrary unit.

6.10 Alat dan Bahan Penelitian

Alat:

1. Skalpel 11.0
2. Jarum 18G, 21G, dan 23G
3. Sentrifugator
4. Inkubator
5. Plate 24 sumuran
6. Sarung tangan

- Bahan Penelitian:**
- **Kultur sel myofibroblas soket kontraktur**
 - 1. Jaringan soket kontraktur pasien yang dilakukan operasi rekonstruksi
 - 2. DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
 - 3. Serum fetal sapi (*Fetal Bovine Serum* atau FBS)
 - 4. Penicillin-Streptomycin (Gibco-Carlsbad, CA)
 - 5. Trypsin 0,05%
 - 6. Phosphate-buffered saline (PBS)

Perlakuan:

Pasase 3 kultur sel myofibroblas diberikan perlakuan TGF- β 1 dosis

0 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml dan 40 ng/ml

6.11 Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel dan Kultur

Jaringan tenon fibrosis dari soket kontraktur pasien didapatkan dari hasil

diseksi jaringan fibrosis saat operasi rekonstruksi soket sesuai indikasi medis.

Jaringan fibrosis hasil diseksi yang biasanya dibuang, disimpan dan dilakukan

kultur dan subkultur. Tindakan ini memenuhi standar deklarasi Helsinki dan

disetujui oleh komisi etik RS Saiful Anwar Malang. Pengambilan sampel dan

kultur adalah sebagai berikut:

1. Jaringan tenon dipotong – potong sebesar 1 mm^3 menggunakan pisau bedah ukuran 11.

2. Sel diletakkan pada media kultur isi 12 dengan 5 ml DMEM media kultur, 50 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin dan 10% FBS.

3. Sel kultura disimpan pada suhu 37°C pada inkubator yang dijaga kelembapannya dengan 5% CO_2 .

4. Media diganti 3 kali seminggu sampai dengan fibroblas/myofibroblas tumbuh dengan baik dan konfluen.
5. Jika fibroblas/myofibroblas telah tumbuh konfluen, dilakukan tripsiniasi dengan larutan 0.25% trypsin/EDTA dalam phosphate buffered saline (PBS), kemudian dilakukan sub kultur dengan flasks 25 cm².
6. Sub kultur dilakukan tiga kali sebelum dilakukan perlakuan, selama 3 minggu.
7. Jika tidak langsung dilakukan pemeriksaan, maka sel disimpan beku pada -80°C.

Perlakuan kultur sel myofibroblas dengan TGF-β1

1. Pasase 3 kultur sel myofibroblas diberikan perlakuan TGF-β1 pada:
 - a. Kelompok 1 tanpa TGF-β1
 - b. kelompok 2 dengan dosis 10 ng/ml
 - c. kelompok 3 dengan dosis 20 ng/ml
 - d. kelompok 4 dengan dosis 40 ng/ml
2. Inkubasi sel pada suhu 37 °C dan 5% CO₂ selama 24 jam
3. Medium diaspirasi dan sel dicuci dengan 1 ml PBS sebanyak tiga kali

Pengukuran Parameter

Pemeriksaan ekspresi RHO GTPase menggunakan ELISA KIT

Alat dan Bahan:

1. Sumuran 96 well
2. Standart (500 ng/ml)
3. Standart diluent
4. Spesial diluent
5. HRP-Conjugate reagent
6. 20x wash buffer

- 7. Cromogen Solution A**
- 8. Cromogen Solution B**
- 9. Stop Solution**
- Prosedur:**
1. Membuat peta well plate.
 2. Semua reagent harus berada pada suhu ruang sebelum digunakan.
 3. Pada blank well jangan tambahkan sampel dan HRP, semua tahap lain sama
 4. Pada standart well ditambahkan 50 μ l standart.
 5. Pada sampel well ditambahkan 40 μ l special diluent dan 10 μ l sampel
 6. Tambahkan 50 μ l HRP pada masing-masing well kecuali blank.
 7. Tutup plate, goyang perlahan inkubasi 60 menit pada 37°C.
 8. Buang semua cairan, isi masing-masing well dengan washing buffer. Campur dan goyangan selama 1 menit, buang cairan washing dan keringkan dengan absorbent paper hingga bersih. Ulang 5 kali.
 9. Dalam keadaan gelap, tambahkan 50 μ l chromogen solution A, selanjutnya tambahkan 50 μ l chromogen solution B, goyang perlahan dan inkubasi 10 menit pada 37°C
 10. Tambahkan 50 μ l stop solution pada masing-masing well (warna biru berubah menjadi kuning)
 11. Baca OD pada 450 nm dalam waktu 15 menit setelah penambahan stop solution
- Pemeriksaan ekspresi JNK menggunakan ELISA KIT**
- Bahan:**
1. *JNK1/2 (Total) Capture Antibody*
 2. *JNK1/2 (Total) Detector Antibody*
 3. *Wash Buffer PT*

Prosedur:

1. Semua reagen diletakkan di suhu ruangan sebelum digunakan.
2. Menambahkan 50 μ L *prepared standard* dan sampel ke dalam sumuran. Tutup plate dan inkubasi dalam suhu ruangan selama 2 jam.
3. Mengaspirasi atau menuangkan larutan dari sumuran dan buang cairan tersebut.
4. Cuci sumuran 4x menggunakan botol pencuci semprot
5. Menambahkan 100 μ L dilusi *detection antibody* ke dalam sumuran. Tutup plate dan inkubasikan dalam suhu ruangan selama 1 jam.
6. Mengaspirasi atau menuangkan larutan dari sumuran dan buang cairan tersebut.
7. Cuci sumuran sampai 4x.
8. Menambahkan 100 μ L dilusi *HRP conjugate* pada sumuran. Tutup plate dan inkubasikan dalam suhu ruangan selama 30 menit.
9. Mengaspirasi atau menuangkan larutan dari sumuran dan buang cairan tersebut.
10. Cuci sumuran sampai 4x.
11. Menambahkan 100 μ L *chromogenic substrate* pada tiap sumuran.
12. Plate diletakkan pada suhu ruangan dan gelap selama 30 menit.

13. Menambahkan 100 μL stop solution pada tiap sumuran. Larutan dalam sumuran akan berubah dari biru menjadi kuning.

14. Plate dievaluasi dalam 30 menit setelah menghentikan reaksi. Baca absorbansi setiap sumuran pada 450 nm dan 550 nm. Kurangkan nilai 550 nm dari nilai 450 nm untuk membetulkan kesalahan optik pada microplate.

Pemeriksaan ekspresi GSK3 menggunakan ELISA KIT

Bahan:

1. GSK 3 β (Total) Capture Antibody
2. GSK 3 β (Total) Detector Antibody
3. Lyophilized GSK 3 β (Total) Control Lysate
4. 10X Wash Buffer PT
5. 50X Cell Extraction Enhancer Solution
6. 5X Cell Extraction Buffer PTR
7. TMB Substrate
8. Simple Step Pre-Coated 96 Sumuran Microplate (12 x 8 sumuran strips)
9. Stop Solution

Prosedur:

1. Menambahkan 50 μL sampel dan standart per sumuran.
2. Menambahkan 50 μl antibody cocktail pada tiap sumuran.
3. Menutup plate dan menginkubasikan 1 jam pada suhu ruangan. Dapat digunakan plate shaker pada 400 rpm.
4. Mengaspirasi setiap sumuran dan cuci 3x dengan 350 μL 1x Wash Buffer pada setiap sumuran. Ulangi 3x.
5. Sesaat sebelum digunakan, mencampurkan (0.5 mL/strip) HRP Label dalam 1X Inkubasi Buffer. Menambahkan 50 μl 1X HRP Label pada tiap sumuran.

Menutup plate dan menginkubasikan 1 jam pada suhu ruangan. Dapat digunakan plate shaker pada 300 rpm.

6. Pencucian dilakukan 4x.

7. Menambahkan $100\mu\text{l}$ TMB substrate pada tiap sumuran dan inkubasi 15 mnt.

8. Tambahkan $100\mu\text{l}$ stop solution pada masing-masing well.

9. Goyangkan plate pada plate shaker selama 1 menit.

10. Baca OD pada 450 nm dalam waktu 15 menit setelah penambahan stop solution.

Pemeriksaan ekspresi MMP-2 menggunakan ELISA KIT

Alat dan bahan:

1. Sumuran 96 well
2. Standart (200 ng/ml)
3. Standart diluent
4. Spesial diluent
5. HRP-Cnjugate reagent
6. 20x wash buffer
7. Cromogen Solution A
8. Cromogen Solution B
9. Stop Solution

Prosedur:

1. Membuat peta well plate.
2. Semua reagent harus berada pada suhu ruang sebelum digunakan.
3. Pada blank well jangan tambahkan sampel dan HRP, semua tahap lain sama.
4. Pada standart well ditambahkan $50\mu\text{l}$ standart.

5. Pada sampel well ditambahkan 40 μ l special diluent dan 10 μ l sampel
6. Tambahkan 50 μ l HRP pada masing-masing well kecuali blank.
7. Tutup plate, goyang perlakan inkubasi 60 menit pada 37°C.
8. Buang semua cairan, isi masing-masing well dengan washing buffer. Campur dan goyangan selama 1 menit, buang cairan washing dan keringkan dengan absorbent paper hingga bersih. Ulang 5 kali.
9. Dalam keadaan gelap, tambahkan 50 μ l chromogen solution A, selanjutnya tambahkan 50 μ l chromogen solution B, goyang perlakan dan inkubasi 10 menit pada 37°C
10. Tambahkan 50 μ l stop solution pada masing-masing well (warna biru berubah menjadi kuning)
11. Baca OD pada 450 nm dalam waktu 15 menit setelah penambahan stop solution

Pemeriksaan ekspresi β -Katenin dengan Elisa kit:

Alat dan Bahan:

1. Sumuran 96 well
2. Standart (100 ng/ml)
3. Standart diluent
4. Spesial diluent
5. HRP-Conjugate reagent
6. 20x wash buffer
7. Cromogen Solution A
8. Cromogen Solution B
9. Stop Solution

Prosedur:

1. Membuat peta *well plate*.
2. Semua reagen harus berada pada suhu ruang sebelum digunakan.
3. Pada *blank well* jangan tambahkan sampel dan HRP, semua tahap lain sama.
4. Pada standart *well* ditambahkan 50 μ l standart.
5. Pada sampel *well* ditambahkan 40 μ l *special diluent* dan 10 μ l sampel.
6. Tambahkan 50 μ l HRP pada masing-masing *well* kecuali *blank*.
7. Tutup *plate*, goyang perlahan inkubasi selama 60 menit pada 37°C.
8. Buang semua cairan, isi masing-masing *well* dengan *washing buffer*. Campur dan goyangan selama 1 menit, buang cairan *washing* dan keringkan dengan *absorbent paper* hingga bersih. Ulang 5 kali.
9. Dalam keadaan gelap, tambahkan 50 μ l *chromogen solution A*, selanjutnya tambahkan 50 μ l *chromogen solution B*, goyang perlahan dan inkubasi 10 menit pada 37°C.
10. Tambahkan 50 μ l *stop solution* pada masing-masing *well* (warna biru berubah menjadi kuning)
11. Baca OD pada 450 nm dalam waktu 15 menit setelah penambahan *stop solution*

Pemeriksaan ekspresi α -Sma dengan imunohistokimia dan mikroskop konfokal

Bahan:

1. Paraformaldehyde 3%
2. Phosphate-buffered saline (PBS)
3. Triton X-100
4. 3% BSA
5. Antibodi primer (1/400 dalam 1x TBS)

6. Sekunder antibodi Alexa Fluor®633-conjugated Goat anti-mouse IgG polyclonal (1/500)
- Prosedur:**
1. Fixasi sampel dengan Paraformaldehyde 3% pada PBS, permeabilisasi dengan 0.1% Triton X-100 dan di blok dengan 3% BSA selama 30 menit pada 25 °C.
 2. Sampel diinkubasi dengan antibody primer (1/400 dalam 1x TBS) selama 3 jam pada 25 °C.
 3. Diberikan sekunder antibody Alexa Fluor®633-conjugated Goat anti-mouse IgG polyclonal (1/500).
 4. Gambar Fluorescent α-SMA myofibroblas didapatkan sebagai warna merah pembesaran 400×, 0.5% kekuatan eksitasi dan gain 850 pada laser scanning confocal microscope (CLSM FV1000 Olympus Corp. Waltham, MA).
 5. Gambar konfokal dianalisa dengan perangkat lunak Olympus Fluoview ver.4.2a. ekspresi α-SMA dihitung dalam satuan arbitrary unit (AU).

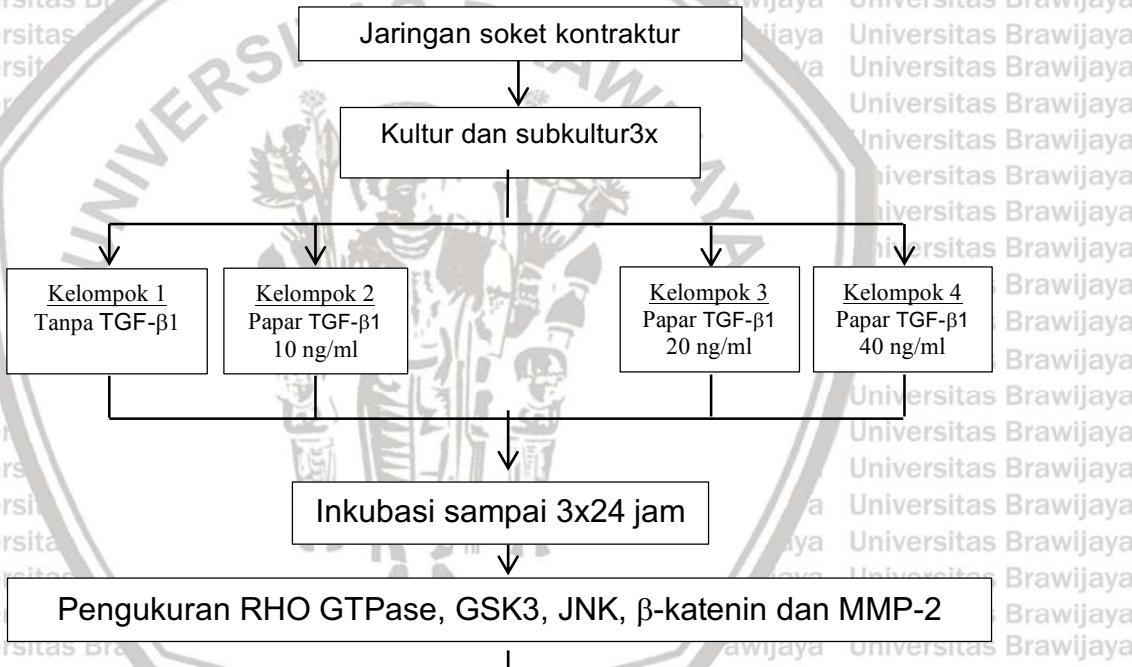
6.12 Analisis Data

Setiap hasil penelitian dicatat dalam buku khusus penelitian (*log book*) dan disimpan dalam file komputer. Sedangkan untuk analisis statistik melalui tahapan sebagai berikut:

- Uji normalitas data dilakukan pada setiap kelompok dengan menggunakan teknik Kolmogorov-Smirnov, dan uji homogenitas dilakukan dengan uji Levene.
- Teknik uji one-way ANOVA digunakan untuk mengetahui rata-rata perbedaan ekspresi RHO GTPase, GSK3, JNK, MMP-2, β-katenin dan α-sma. Signifikansi statistik ditentukan jika nilai $p \leq 0,05$.

- Bila dengan uji one-way ANOVA didapatkan perbedaan bermakna, maka perhitungan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (*Multiple comparison Tukey*), untuk mengetahui kelompok dengan hasil bermakna.
- Apabila uji normalitas dan homogenitas data tidak terpenuhi, maka dilakukan uji non-parametrik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney.
- Data disajikan dalam bentuk tabulasi menggunakan program SPSS 19.

6.13 Alur Penelitian Tahap 2

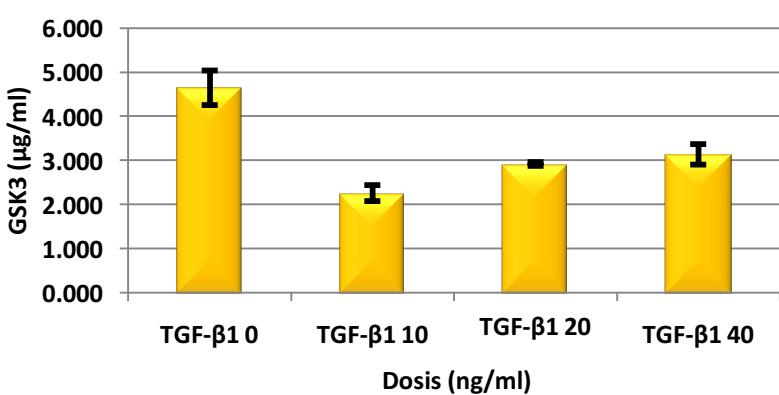


6.14 Hasil Penelitian dan Pembahasan Penelitian Tahap 2

6.14.1 Pengaruh TGF- β 1 terhadap GSK3

Pada penelitian ini didapatkan rata-rata kadar GSK3 sebesar 4.652 ± 0.393 , 2.259 ± 0.179 , 2.916 ± 0.046 , dan $3.139 \pm 0.231 \mu\text{g/ml}$ berturut-turut, untuk kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 0, 10, 20 dan 40 ng/ml (Gambar 6.1).

Hasil pengujian perbedaan pengaruh dosis TGF- β 1 terhadap GSK3 dengan Anova dan analisis Mann Whitney menunjukkan bahwa kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki GSK3 yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 10, 20 dan 40 ng/ml. Sedangkan kelompok dengan TGF- β 1 10 ng/ml memiliki GSK3 paling rendah dan berbeda signifikan dengan kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1, TGF- β 1 20 dan 40 ng/ml. TGF- β 1 menurunkan ekspresi GSK3, namun peningkatan dosis TGF- β 1 cenderung meningkatkan ekspresi GSK3.



Gambar 6.1. Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap Ekspresi GSK3. Kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 10 ng/ml memiliki rata-rata GSK3 yang paling rendah, sedangkan kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki rata-rata GSK3 yang paling tinggi.

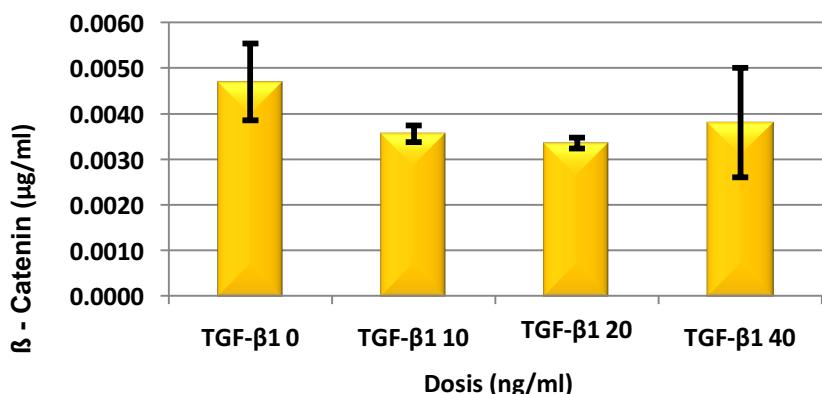
GSK3 berinteraksi dengan jalur sinyaling lain diantaranya jalur TGF- β . GSK3 merupakan komponen penting, namun belum diketahui dengan jelas mekanisme dan perannya. Pada sel fibroblas paru, TGF- β 1 menghambat

ekspresi GSK3 dan menyebabkan translokasi β -katenin. Namun TGF- β 1 juga dapat meningkatkan ekspresi Ser-9-phosphorilated GSK3 (Caraci *et al.*, 2008). Jalur TGF- β juga memiliki fungsi dikotom, sebagai pro dan anti tumor pada penelitian ini, TGF- β menurunkan GSK3, maka TGF- β bersifat antagonis terhadap GSK3 pada jaringan myofibroblas soket kontraktur (Guo *et al.*, 2008; Mancinelli *et al.*, 2017).

GSK3 β pada fibroblast tikus dapat mengendalikan proses penyembuhan luka dan pembentukan fibrosis melalui mekanisme endothelin-1 dependent (Kapoor *et al.*, 2008)

Sinyaling GSK3 meregulasi TGF- β 1 dalam menginduksi deferensiasi myofibroblas melalui fosforilasi Creb. GSK3 kemungkinan menjadi target yang berguna dalam terapi penyakit paru fibrosis (Baarsma *et al.*, 2013).

6.14.2 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap β -katenin



Gambar 6.2: Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap β -katenin. Kelompok dengan TGF- β 1 20 ng/ml memiliki rata-rata β -katenin paling rendah, sedangkan tanpa TGF- β 1 memiliki rata-rata paling tinggi.

Pada penelitian ini didapatkan rata-rata kadar β -katenin sebesar 0.0047 ± 0.0008 , 0.0036 ± 0.0002 , 0.0034 ± 0.0001 dan 0.0038 ± 0.0012 ng/ml, berturut-turut pada kelompok dengan dosis TGF- β 1 sebesar 0,10, 20 dan 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gambar 6.2).

Berdasarkan analisis deskriptif dari keempat perlakuan diketahui bahwa kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 20 ng/ml memiliki rata-rata β -katenin yang paling rendah, sedangkan kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki rata-rata β -katenin yang paling tinggi. Pengujian perbedaan pengaruh dengan Kruskal Walis dan analisis hubungan dosis TGF- β 1 dan β -katenin dilakukan menggunakan korelasi Rank Spearman, dinyatakan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan dosis TGF- β 1 dengan β -katenin. Penambahan dosis TGF- β 1 cenderung menurunkan ekspresi β -katenin, namun hubungan ini tidak signifikan.

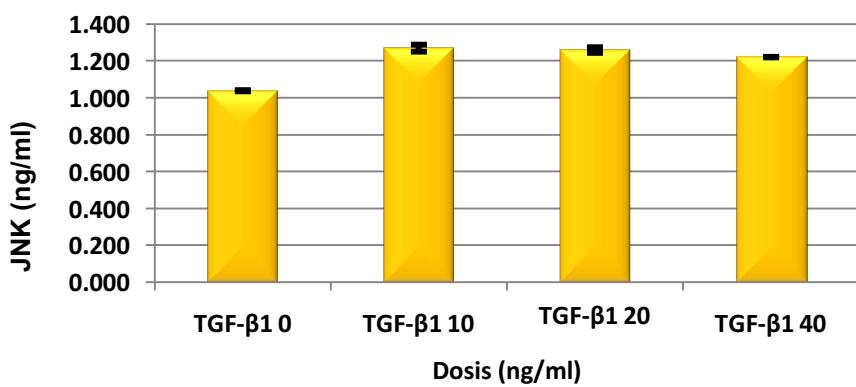
TGF- β 1 berinteraksi dengan jalur sinyaling lain seperti Wnt/ β -katenin dan Rho untuk menginduksi efek biologis yang lain. Hal ini memberikan dugaan bahwa jalur Wnt/ β -katenin dan Rho memediasi jalur dibawahnya dengan dirangsang oleh TGF- β 1. Hubungan antara β -katenin dan Rho GTPase dapat menyebabkan migrasi dan diferensiasi yang diinduksi oleh TGF- β 1. Kompleks degradasi β -katenin terdiri atas axin, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) dan adenomatous polyposis coli (APC) (Shao et al. 2011).

Sinyaling Wnt kanonikal sangat penting untuk TGF- β dalam memediasi proses fibrosis dan memiliki peran penting dalam interaksi jalur sinyaling reseptor TGF- β dan ligan TGF- β pada pathogenesis penyakit fibrosis. Ikatkan pada reseptor Wnt akan menginduksi kaskade sinyaling intaseluler termasuk *Disheveled, Axin, Adenomatosis Polyposis Coli and Glycogen Synthase Kinase-3 β* , menyebakan stabilisasi β -Katenin mencapai puncaknya. β -Katenin translokasi kedalam nukleus, dan berikatan dengan *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/Lef)* untuk menginduksi transkripsi gen target Wnt.

Oleh karena itu kadar β -Katenin yang terukur pada plasma rendah (Akhametshina et al., 2012). Peningkatan regulasi sinyaling TGF- β melalui SMAD2 dalam β -

catenin-dependent mechanism pada kultur fibroblas, akan meningkatkan pembentukan fenotip “myofibroblastlike” (Carthy et al., 2011). Pada studi oleh Poon et al. (2009) disampaikan bahwa β -katenin lebih meregulasi motilitas sel, dibandingkan dengan efek induksi kontraksi kolagen lattice (Poon et al., 2009). β -katenin teraktifasi dalam 2 cara, pertama, ekspresi β -katenin meningkat, namun terjadi translokasi ke nukleus. Kedua, ekspresi β -katenin tetap disitoplasma dan dapat terjadi aktifikasi. Sehingga ekspresi β -katenin pada plasma sangat rendah/stabil dapat karena translokasi ke inti sel atau β -katenin tidak terlibat dalam jalur fibrosis oleh stimulasi TGF- β 1 tersebut (DiRenzo et al., 2016).

6.14.3 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap JNK



Gambar 6.3. Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap JNK. Kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki rata-rata JNK yang paling rendah, sedangkan Kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 10 ng/ml memiliki rata-rata JNK yang paling tinggi.

Pada penelitian ini didapatkan rata-rata JNK sebesar 1.037 ± 0.004 , 1.269 ± 0.018 , 1.258 ± 0.016 dan 1.220 ± 0.002 ng/ml, pada pemberian dosis TGF- β 1 sebesar 0, 10, 20 dan 40 ng/ml (Gambar 6.3).

Berdasarkan analisis deskriptif dari keempat perlakuan dapat diketahui bahwa kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki rata-rata JNK yang

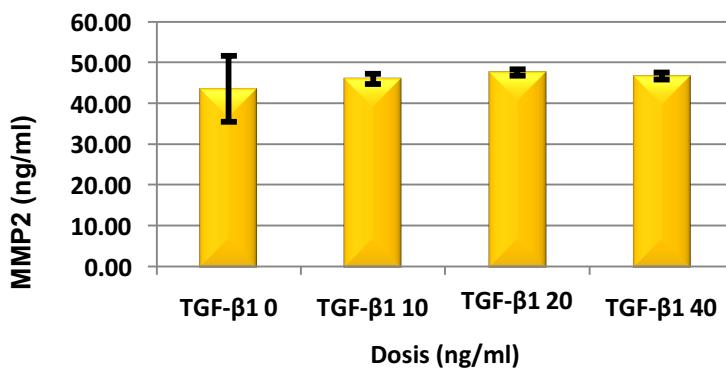
paling rendah, sedangkan Kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 10 ng/ml memiliki rata-rata JNK yang paling tinggi. Analisis hubungan dosis TGF- β 1 dan JNK dilakukan menggunakan korelasi Pearson. Hubungan dosis TGF- β 1 dengan JNK menghasilkan probabilitas sebesar 0.002 ($\alpha < 5\%$). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa ada hubungan yang signifikan dosis TGF- β 1 dengan JNK. Penambahan TGF- β 1 dapat meningkatkan ekspresi JNK secara signifikan, namun penambahan dosisnya cenderung menurunkan ekspresinya, walaupun tidak signifikan. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) berpengaruh pada translokasi inti sel dan meregulasi sinyaling TGF- β 1. Jun N-Terminal Kinase (JNK) termasuk komponen jalur MAPK. TGF- β 1 menginduksi proses yang berbeda dan terjadi respon yang tumpang tindih pada organ yang berbeda (Pohlers *et al.*, 2009).

Reseptor TGF- β dapat pula mengaktifkan sinyaling MAPK pada pengikatan ligand, termasuk ERK, JNK dan P38 MAPK. Dalam diderensiasi myofibroblas, respon cepat ERK dan P38 MAPK dapat diobservasi terhadap TGF- β pada kultur fibroblast (Carthy, 2018).

Jalur JNK merupakan salah satu kunci terjadinya fibrosis. JNK memegang peranan penting dalam regulasi respon terhadap TGF- β melalui fosforilasi dan translokasi ke inti (Fabre *et al.*, 2014).

6.14.4 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap MMP2

Nilai rata-rata MMP2 sebesar 43.56 ± 8.04 , 45.99 ± 1.30 , 47.57 ± 0.79 dan 46.73 ± 0.89 ng/ml pada kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 0, 10, 20 dan 40 ng/ml. Berdasarkan analisis deskriptif diketahui bahwa kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki rata-rata MMP2 yang paling rendah,



Gambar 6.4. Pengaruh Dosis TGF-β1 terhadap MMP2. Kelompok tanpa TGF-β1 memiliki rata-rata MMP2 paling rendah, sedangkan kelompok dengan TGF-β1 20 ng/ml memiliki rata-rata MMP2 paling tinggi

Analisis hubungan dosis TGF-β1 dan MMP2 dengan korelasi Pearson menghasilkan probabilitas sebesar 0.642. Hal ini dapat dinyatakan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan dosis TGF-β1 dengan MMP2. Hal ini berarti semakin tinggi dosis TGF-β1 maka MMP2 semakin tinggi, dan sebaliknya semakin rendah dosis TGF-β1 maka MMP2 semakin rendah, namun tidak signifikan.

Review oleh Dai menuliskan bahwa terjadi perubahan kinetik produksi MMP-2, MMP-9, TIMP-1 dan TIMP-2 dan α SMA yang merupakan marker myofibroblas. (Dai *et al.*, 2013). Selain menginduksi α SMA pada myofibroblas, TGF-β1 juga meregulasi remodeling matrik ekstraseluler. TGF-β1 memiliki 2 target gen utama yaitu kadar urokinase dan PAI-1, namun juga meregulasi PAI-2 and MMP-2 (Hawinkels *et al.*, 2009). Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Peterova (2016) yang menyatakan ekspresi MMP-2 tidak berubah bermakna pada kultur sel fibroblas dengan 3D gel kolagen (Peterova, 2016).

MMP-2 disupresi oleh TGF- β 1, sebagai promotor fenotif kontraktil pada *vascular smooth muscle cells* (Risinger et al., 2010). Sedang pada penelitian Lee et al. (2010) didapatkan hasil bahwa TGF- β 1 meningkatkan ekspresi dan aktifitas MMP2 pada angioma kulit. Hal ini menunjukkan bahwa TGF- β 1 memiliki efek yang berbeda pada jaringan yang berbeda, tampak pula pada penelitian Gomes et al. (2012).

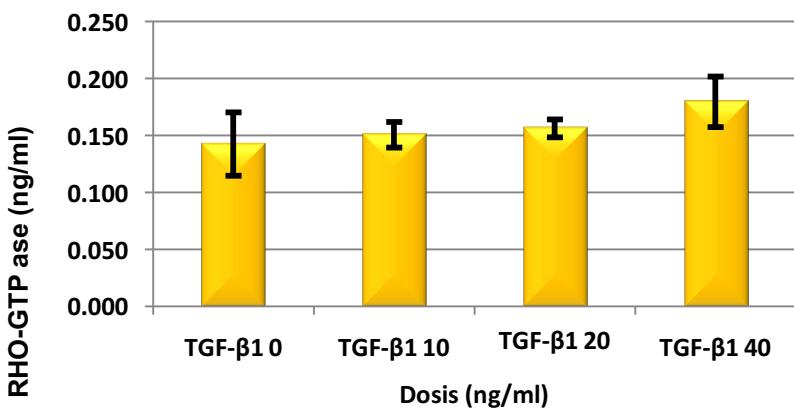
6.14.5 Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTPase

Nilai rata-rata RHO-GTPase pada penelitian ini sebesar 0.142 ± 0.028 ,

0.151 ± 0.01 , 0.156 ± 0.008 dan 0.179 ± 0.022 ng/ml pada kelompok yang

diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 0, 10, 20 dan 40 ng/ml.

Berdasarkan analisis deskriptif bahwa kelompok yang tidak diberikan dosis TGF- β 1 memiliki rata-rata RHO-GTPase yang paling rendah, sedangkan kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 40 ng/ml memiliki rata-rata RHO-GTPase yang paling tinggi (gambar 6.5).



Gambar 6.5. Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTPase. Kelompok tanpa TGF- β 1 memiliki rata-rata RHO-GTPase paling rendah, sedangkan kelompok dengan TGF- β 1 40 ng/ml memiliki rata-rata RHO-GTPase paling tinggi

Pengujian perbedaan pengaruh dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTPase dilakukan menggunakan ANOVA dengan statistik uji F sebesar 2.075 dengan

probabilitas sebesar 0.182 ($\alpha > 5\%$). Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa tidak ada perbedaan pengaruh yang signifikan dosis TGF- $\beta 1$ terhadap RHO-GTPase. Penambahan TGF- $\beta 1$ dapat meningkatkan ekspresi RHO-GTPase dan peningkatan dosis TGF- $\beta 1$ cenderung meningkatkan ekspresi RHO-GTPase namun perbedaan pengaruhnya tidak signifikan.

Rho-associated kinases (Rock) mediator utama RHO-GTPase dan memiliki peran penting dalam pembentukan actin cytoskeleton. TGF- β mengaktifkan ERK pada Rock-dependent manner dan ERK memediasi sebagian efek perangsangan Rock pada diferensiasi myofibroblas. Efek samping toksik penghambatan Rock tidak ditemukan. Sehingga Rock potensial merangsang diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas dan produksi ECM pada konsentrasi biologis tanpa toksitas sel (Akhmetshina, 2008).

Aktifitas fungsional antara myofibroblas dan sel otot polos adalah, bila pada otot polos kontrakturnya pendek dan cepat, sedang pada myofibroblas lebih lama dan menyebabkan retraksi jaringan, kemungkinan distabilkan oleh deposisi ECM.

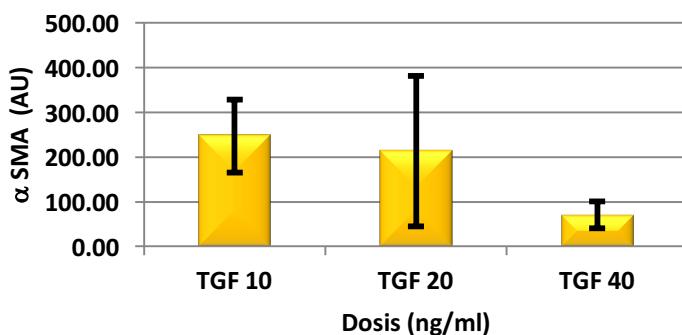
Aktifitas kontraktil myofibroblas dapat diregulasi oleh jalur Rho/ROCK/myosin light chain phosphatase (Bochaton-Piallat, 2016).

Jalur Rho/Rock dan sinyaling Smad signaling bersama-sama terlibat dalam perubahan fibroblas menjadi myofibroblas oleh induksi TGF- $\beta 1$. Kedua jalur saling cross-talk pada diferensiasi fibroblas paru in vitro. Titik spesifik persilangan antara kedua jalur tersebut, mungkin dapat menjadi target terapi yang lebih efektif (Ji et al., 2014).

6.14.6 Pengaruh Dosis TGF- $\beta 1$ terhadap α SMA

Nilai rata-rata α SMA pada penelitian ini sebesar 56.37 ± 7.57 , 246.86 ± 81.72 , 212.94 ± 168.43 dan 70.31 ± 30.10 AU (arbitrary unit) pada kelompok yang diberikan dosis TGF- $\beta 1$ sebesar 0, 10, 20 dan 40 ng/ml (gambar 6.6).

Berdasarkan analisis deskriptif bahwa kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 10 ng/ml memiliki rata-rata α SMA yang paling tinggi, sedangkan kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 40 ng/ml memiliki rata-rata α SMA yang paling rendah. Penambahan TGF- β 1 dapat meningkatkan ekspresi α SMA dan peningkatan dosis TGF- β 1 cenderung menurunkan ekspresi α SMA dengan perbedaan pengaruh yang signifikan.



Gambar 6.6. Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap α SMA. Kelompok TGF- β 1 10 ng/ml memiliki rata-rata α SMA paling tinggi, sedangkan kelompok TGF- β 1 40 ng/ml memiliki rata-rata α SMA paling rendah

Pada ekspresi α SMA didapatkan kelompok dosis TGF- β 1 10 ng/ml

memiliki rata-rata α SMA yang paling tinggi, sedangkan kelompok yang diberikan dosis TGF- β 1 sebesar 40 ng/ml memiliki rata-rata α SMA yang paling rendah.

Analisis hubungan dosis TGF- β 1 dan α SMA dilakukan menggunakan korelasi

Pearson, dinyatakan bahwa ada hubungan yang signifikan, negatif (berlawanan) dan kuat antara dosis TGF- β 1 dengan α SMA. Hal ini berarti semakin tinggi dosis

TGF- β 1 maka α SMA semakin rendah, dan sebaliknya semakin rendah dosis TGF- β 1 maka α SMA semakin tinggi. TGF- β 1 didalam ECM sebagai komplek

laten yang besar termasuk *latency associated peptide* dan *latent TGF- β 1 binding protein*. Kompleks ini dapat dibebaskan oleh enzim proteolitik seperti integrin dengan mekanisme mekanis. Kekuatan ini digunakan strees fiber melalui trans

membrane untuk membebaskan TGF- β 1 dari kompleks laten yang besar, sehingga menjadi bentuk aktif dalam proses fibrosis. Peran integrin sangat besar untuk terjadinya aktifasi TGF- β 1 dalam proses fibrosis, sedangkan dalam penelitian ini faktor adanya integrin tidak diteliti. Kemungkinan karena berada pada media kultur, maka tidak terdapat integrin seperti pada lingkungan yang seharusnya (Bocheton-Piallat, 2016). Satu penelitian menyebutkan FGF-1 memiliki fungsi antifibrotik. FGF-1 meregulasi ekspresi kolagen dan antagonis efek profibrotik TGF- β 1. FGF-1 menghambat induksi TGF- β 1 terhadap fosforilasi Smad2, namun mekanismenya belum jelas benar. FGF-1 menurunkan ekspresi α SMA dan meningkatkan ekspresi fibronectin (EDA-FN). Ekspresi α SMA dan fibronectin (EDA-FN) menurun secara signifikan bila sel dikultur pada gel kolagen. Ekspresi α SMA lebih dipengaruhi oleh lingkungan sel dan mungkin dapat berubah oleh pengaruh agen lain (Peterova, 2016).

Studi lain menyebutkan bahwa ekspresi α SMA menurun dengan meningkatnya densitas sel. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh antara kontak sel-sel dan penyebaran sel mungkin berpengaruh pada regulasi EMT (O'Connor, 2016).

6.15 KESIMPULAN

Pada penelitian tahap 2 ini didapatkan kesimpulan bahwa peningkatan dosis TGF- β 1 meningkatkan ekspresi JNK secara signifikan, meningkatkan ekspresi RHO GTPase namun tidak signifikan, menurunkan ekspresi GSK3 dan α -SMA secara signifikan, serta tidak berpengaruh pada ekspresi MMP-2 dan β -katenin pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.

Orbital soket kontraktur merupakan keadaan berkerutnya soket mata, sehingga mata palsu (protesa) sulit atau tidak dapat terpasang. Masalah utama yang terjadi akibat orbital soket kontraktur adalah penampilan kosmetika pasien yang tidak memiliki mata. Walaupun penglihatan tetap tidak dapat berfungsi kembali, namun secara kosmetika pasien memiliki penampilan yang normal. Penampilan kosmetis yang normal ini sulit didapatkan karena orbital soket kontraktur sering berkerut kembali, walaupun sudah dilakukan upaya rekonstruksi dengan teknik dan baik (Poonyathalang *et al.*, 2005; Mavrikakis *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2007).

Jaringan soket kontraktur didominasi oleh scar hipertropik (fibrosis/scarring) akibat penyimpangan penyembuhan luka berupa aktivitas fibroblas, pembentukan myofibroblas dan deposisi matrik ekstraselular (*Extra Cellular Matrix/ECM*) yang berlebihan selama periode penyembuhan luka. Penyimpangan proses penyembuhan luka terjadi saat dilakukan operasi anoftalmia (pengambilan bola mata) ataupun akibat rekonstruksi soket yang dilakukan agar protesa dapat terpasang serta diperparah oleh adanya iritasi kronis akibat gesekan protesa dengan soket (Su *et al.*, 2010).

Patogenesis terjadinya soket kontraktur dapat disebabkan oleh banyak faktor. TGF- β 1 sebagai sitokin profibrotik utama merupakan salah satu faktor penyebab dan dapat pula dipengaruhi oleh faktor atau protein yang lain. Pada penelitian ini difokuskan pada TGF- β 1 dan beberapa protein yang berhubungan dan merupakan sinyaling lanjutan dari TGF- β 1 sampai terjadinya fibrosis soket kontraktur. TGF- β 1 adalah sitokin multifungsional yang meregulasi morfogenesis

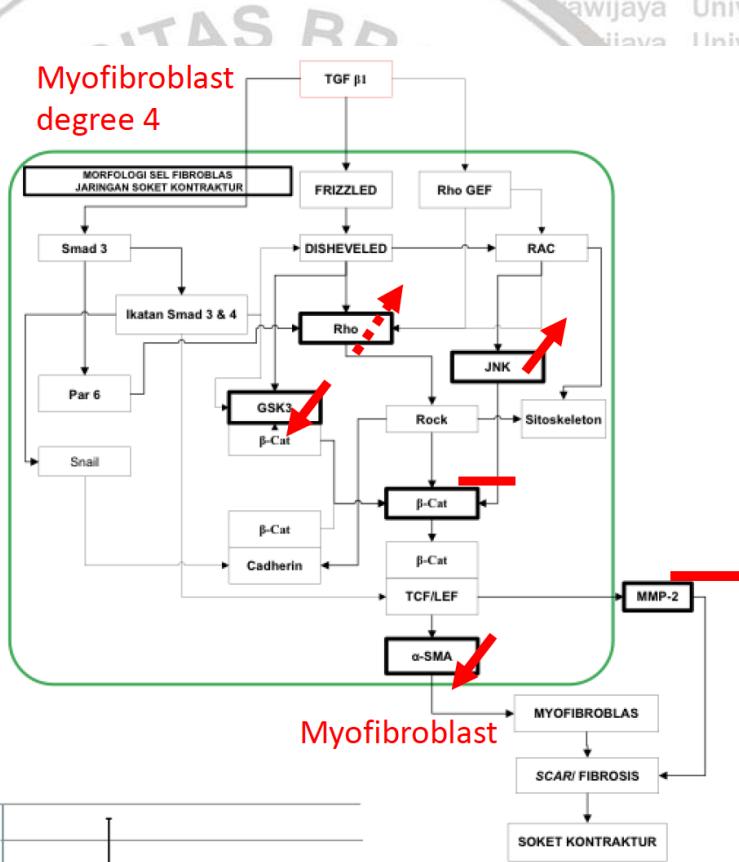
dan diferensiasi jaringan melalui sel proliferasi, diferensiasi, apoptosis dan produksi matrik ekstraselular (Willis, 2007; Li *et al.*, 2011). Sinyal TGF- β 1 melalui jalur Smad-dependen dan Smad-independen. Jalur Smad-dependen (Smad2/3) mengaktifkan perubahan seluler yang diinduksi TGF- β , misalnya sintesa dan sekresi kolagen yang akan meningkatkan pembentukan scar. Jalur sinyaling Smad-independen (melalui Mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3 kinase PI3K) atau Rho/rho-associated kinase) meningkatkan penyembuhan luka. Oleh karena itu, penghambatan TGF- β dapat mengurangi terjadinya scarring tetapi juga menyebabkan terlambatnya proses penyembuhan luka pada epitel konjungtiva (Yamanaka *et al.*, 2006; Willis, 2007; Ellis *et al.*, 2009; Schachtrup *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

TGF- β memegang peranan terbesar pada setiap fase ita proses penyembuhan luka mata dengan meningkatkan sekresi growth factor yang terlibat pada migrasi sel, proliferasi, deposisi ECM dan pembentukan myofibroblas. Oleh karenanya TGF- β masih menjadi target kunci yang potensial untuk intervensi pengobatan proses scarring (Ellis *et al.*, 2009). TGF- β merupakan sitokin multifungsional yang megulasi morfogenesis dan diferensiasi jaringan melalui efek proliferasi sel, differensiasi, apoptosis dan produksi matrik ekstra selular. TGF- β merupakan ‘master switch’ dalam proses fibrosis (Willis, 2007; Carthy, 2018).

TGF- β 1 merupakan sitokin yang rumit dengan 2 aktifitas pada sel kanker. Sitokin ini merupakan mediator penting dalam invasi, metastasis dan angiogenesis kanker. Namun pada sisi lain, TGF- β 1 juga memiliki fungsi anti tumor. Penjelasan untuk hal ini memerlukan pemahaman mekanisme yang terlibat dalam perubahan antara supresor ke promotor tumor. Satu aspek penting fungsi TGF- β 1 adalah interaksi dengan protein dalam microenvironment. Beberapa protein stromal memiliki kemampuan alami untuk berinteraksi dan

memodulasi fungsi TGF- β 1. MMP, integrin, ROS dan molekul stromal lainnya mengaktifkan TGF- β 1 dengan mengambil sitokin bentuk latennya, membangkitkan protein matur dan dengan demikian meregulasi bioavailabilitasnya (Contanza, 2017). Diharapkan dengan penelitian ini dan penelitian selanjutnya dapat diketahui pula mekanisme regulasi TGF- β 1 sebagai supresor dan promotor pada jaringan lain selain sel kanker, misalnya jaringan fibrosis.

Pada sel myofibroblas dari soket kontraktur derajat 4 didapatkan gambaran sebagai berikut:



Peningkatan dosis TGF- β 1 pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur meningkatkan ekspresi JNK, sedikit meningkatkan ekspresi RHO GTPase, menurunkan ekspresi GSK3 dan α -SMA, serta tidak berpengaruh pada ekspresi MMP-2 dan β -katenin.

Pada penelitian ini sampel diambil dari jaringan orbital soket kontraktur dengan kultur primer. Pada awalnya kami bertujuan untuk mengetahui proses biomolekular yang mungkin terjadi secara spesifik pada jaringan kontraktur yang telah berulang terjadi ini (rekurrensi) dan kami berharap sel patologis (myofibroblas) yang kami dapat dari jaringan kontraktur ini dapat berubah kembali menjadi bentuk semula (fibroblas) dengan mengubah *microenvironment* dan perlakuan subkultur/pasase yang bersifat lebih sederhana dari lingkungan tumbuh seharusnya dalam jaringan. Namun perubahan sel menjadi bentuk normal kembali (fibroblas) tidak didapatkan, sehingga hal ini justru memberikan gambaran hasil yang didapat berasal dari jaringan kontraktur (myofibroblas) yang mungkin akan memberikan gambaran spesifik dan respon yang berbeda.

Beberapa keterbatasan penelitian ini adalah tidak dilakukan pengukuran protein ekstra selular matrik (ECM) seperti kolagen, untuk mengkonfirmasi efek TGF- β 1 dalam meregulasi protein ECM, tidak dipertimbangkan banyaknya pasase dan tingkat TGF- β 1 jaringan tersebut sebelum perlakuan, tidak diperiksa populasi sel sebelum dan sesudah perlakuan, identifikasi inti sel dan indikator apoptosis serta dalam penelitian lebih lanjut perlu diamati pula kemungkinan peran aktivasi FAK dalam degradasi α -SMA.

Universitas Brawijaya

BAB 8

KESIMPULAN DAN SARAN

8.1 KESIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan kesimpulan:

1. Peningkatan jumlah pasase meningkatkan ekspresi α -SMA dan tidak mengubah morfologi sel myofibroblas menjadi fibroblas.

2. Pemberian TGF- β 1 10 ng/mL tidak mampu mempertahankan, bahkan menurunkan ekspresi α SMA dan morfologi sel tetap dalam bentuk myofibroblas dengan peningkatan jumlah pasase

3. Peningkatan dosis TGF- β 1 pada pasase 3 menurunkan ekspresi α -SMA dan tidak mengubah morfologi sel myofibroblas.

4. Peningkatan dosis TGF- β 1 meningkatkan ekspresi JNK, sedikit meningkatkan ekspresi RHO GTPase, menurunkan ekspresi GSK3 dan α -SMA, serta tidak berpengaruh pada ekspresi MMP-2 dan β -katenin pada kultur sel myofibroblas soket kontraktur.

• Morfologi sel myofibroblas tidak dapat berubah kembali menjadi sel fibroblas.

8.2 SARAN

Saran pada penelitian ini:

• Percobaan *in vitro* untuk mempelajari myofibroblas dari jaringan soket kontraktur orbital harus mempertimbangkan banyaknya subkultur/pasase dan tingkat TGF- β 1 jaringan tersebut sebelum perlakuan.

- Penelitian *in vivo* dan *in vitro* dapat memberikan hasil yang jauh berbeda, oleh karenanya harus diperhatikan tujuan dari penelitian tersebut.

- Research Question pada penelitian ini adalah

- Apakah TGF- β 1 memberikan respon yang berbeda atau bahkan berlawanan pada jaringan soket kontraktur (myofibroblas).

- Apakah TGF- β 1 mampu menjadi agen anti-fibrotik?



DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari R.K., Khazai H, Usha K.D. 2007. Prospective Evaluation of Contracted Sockets. *Kathmandu University Medical Journal* 5 (3): 391-5.
- Aguilar GL, Shannon GM, Flanagan JC. 1982. Experience with dermis-fat grafting: an analysis of early postoperative complications and methods of prevention. *Ophthalmic Surgery*; 13(3): 204-9.
- Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Szucs G, Spriewald BM, Zwerina J et al. 2008. Rho-Associated Kinases Are Crucial for Myofibroblast Differentiation and Production of Extracellular Matrix in Scleroderma Fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 58, No. 8, August 2008, pp 2553–2564. DOI 10.1002/art.23677
- Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P et al. 2012. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nature communications* 3:735. DOI: 10.1038/ncomms1734
- Anscher MS. 2010. Targeting the TGF- β 1 Pathway to Prevent Normal Tissue Injury After Cancer Therapy. *The Oncologist*. 15:350 –359
- Arora K. 2018. Soft tissue Fibroblastic/myofibroblastic tumors Desmoplastic fibroblastoma. Revised: 29 January 2018, last major update July 2012. Copyright: (c) 2002-2018, PathologyOutlines.com, Inc. PubMed Search: [Desmoplastic fibroblastoma](#).
- Bajaj MS, Pushker N, Singh KK, Chandra M, Ghose S. 2006. Evaluation of Amniotic Membrane Grafting in The Reconstruction of Contracted Socket. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*; 22 (2) : 116-20.
- Baarsma HA, Engelbertink LHJM, van Hees LJ, Menzen MH, Meurs H, Timens W, et al. 2013. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) regulates TGF- β 1-induced differentiation of pulmonary fibroblasts. *British Journal of Pharmacology* (2013) 169 590–603. DOI:10.1111/bph.12098 www.brjpharmacol.org
- Baum J, Duffy HS. 2011. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. April 2011; 57(4): 376–379.
- Beurel, E., Grieco, S.F. Jope, R.S. 2014. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases, *Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016
- Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B. 2016. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions [version 1; referees: 2 approved] F1000 Research, 5(F1000 Faculty Rev):752 (doi:10.12688/f1000research.8190.1)
- Bulut G, Kurdroglu Z, Bozdemir Y D, Kurdroglu M, Erten R. 2015. Original Article: Effects of jnk inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(8): 8774-85
- Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, et al. 2008. TGF- β 1 targets the GSK-3 β /β-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacological Research*. 2008 Apr;57(4):274-82. doi: 10.1016/j.phrs.2008.02.001. Epub 2008 Feb

- 9.
- Carthy JM, Garmaroudi FS, Luo Z, McManus BM. 2011. Wnt3a Induces Myofibroblast Differentiation by Upregulating TGF- β Signaling Through SMAD2 in a b-Catenin-Dependent Manner. *PLoS ONE* | www.plosone.org 1 May 2011 | Volume 6 | Issue 5 | e19809
- Carthy JM. 2018. TGF β signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders. *Journal of Cellular Physiology*. 2018; 233: 98–106. DOI: 10.1002/jcp.25879
- Chen X, Thibeault SL. 2012. Response of fibroblasts to transforming growth factor- β 1 on two-dimensional and in three-dimensional hyaluronan hydrogels. *Tissue Engineering: Part A* 18 (23 – 24): 2528 – 2538. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0094.
- Chou S.F., Chang S. W., Chuang J.L.. 2007. Mitomycin C Upregulates IL-8 and MCP-1 Chemokine Expression via Mitogen-Activated Protein Kinases in Corneal Fibroblasts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. May 2007. Vol. 48 (5): 2009-16
- Cohen P, Goedert M. 2012. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nature Reviews: Drug Discovery*. June 2012. Volume 7. Issue 6: 479
- Connor J W, Mistry K, Detweiler D, Wang C, Gomez E W. 2016. Cell-cell contact and matrix adhesion promote qSMA expression during TGF β 1-induced epithelial-myofibroblast transition via Notch and MRTF-A. *Scientific Reports*. 6:26226
- Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. 2017. Stromal Modulators of TGF- β in Cancer. *Journal of Clinical medicine* 6(7) doi:10.3390/jcm6010007
- Cordeiro MF, Chang L, Lim KS, Daniels JT, Pleass LD, Siriwardena D, et al. 2000. Modulating Conjunctival Wound Healing. *Eye*, 14: 536-547.
- Dai Y, Khaidakov M, Wang X, Ding Z, Su W, Price E et al. 2013. MicroRNAs Involved in the Regulation of Postischemic Cardiac Fibrosis. *Hypertension* 61:751-756. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00654
- Daniels J.T., Cambrey A.D., Occleston N.L., Garrett Q, Tarnuzzer R.W., Schultz G.S., et. al. 2003. Matrix Metalloproteinase Inhibition Modulates Fibroblast-Mediated Matrix Contraction and Collagen Production *In vitro*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 44:1104–10
- Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. 2014. Fibro-blasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 7: 301 – 311. doi: 10.2147/CCID.S50046.
- Detorakis ET, Engstrom RE, Straatsma BR, Demer JL. 2003. Functional Anatomy of the Anophthalmic Socket: Insights from Magnetic Resonance Imaging. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 44: 4307-13.
- Dewi D.S. Succesful of Mitomycin C Application in the Reconstruction of Recurrent Contracted Socket: a case report. The 27th Asia Pasific Academy of Ophthalmology Congress. Busan, Korea. April 13-16th 2012.
- DiRenzo DM, Chaudhary MA, Shi X, Franco SR, Zent J, Wang K. 2016. A

- Crosstalk between TGF- β /Smad3 and Wnt/ β -Catenin Pathways Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Cell Signal*; 28(5): 498–505. doi:10.1016/j.cellsig.2016.02.011.

Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang X, et al. 2010. Smad3 Signaling Critically Regulates Fibroblast Phenotype and Function in Healing Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 107:418–428.

Dodi AE, Huang SK, Ajayi O, Sisson TH, Horowitz JC. 2015. TGF- β 1 Suppression of Fas Expression in Fibroblasts is FAK-Dependent and Antagonizes the Pro-Apoptotic Effects of TNF- α and IFN- γ . In *C37. Structural and Hematopoietic Cell Interactions* (pp. A4288-A4288). American Thoracic Society.

Dua HS. 1999. Amniotic membrane Transplantation. *Br J Ophthalmol*. 83: 748–52.

Ellis JS, Paull DJ, Dhingra S, Khalili A, Notara M, Brocchini S, et al. 2009. Growth Factors and Ocular Scarring. *European Ophthalmic Review*. p: 58-63

Fabre T, Kared H, Friedman SL, Shoukry NH. 2014. IL-17A Enhances the Expression of Profibrotic Genes through Upregulation of the TGF- β Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 193: 3925–3933.

Forte A, DellaCorte A, DeFeo M, Cerasuolo F, Cipollaro M. 2010. Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm. *Oxford Journals* 88: 395-405.

Fritz RD, Pertz O. 2016. The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev): 749

Funamaya E, Chodon T, Oyama A, Sugihara T. 2003. Keratinocytes Promote proliferation and Inhibit Apoptosis of the Underlying Fibroblasts: An Important Role in the Pathogenesis of Keloid. *J Invest Dermatol*. 121: 1326-31

Garber PF, Della Rocca RC. Socket Reconstruction. 1996. In: Levine MR (ed). *Manual of Oculoplastic Surgery*. 2nd ed. New York: Butterworth-Heinemann: 309-17.

Garg K, Corona B T, Walter T J. 2015. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Frontiers in Pharmacology*. April 2015. Volume 6. Article 87

Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. 2011. Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies. *Mol Med* 17 (1-2): 113-25.

Gomes LR, Terra LF, Wailemann RAM, Labriola L, Sogayar MC. 2012. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *Bio Med Central Cancer*, 12:26. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/26>

Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang X. 2008. Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- β signaling. *Genes &*

- Development 22:106–120. Press ISSN 0890-9369/08; www.genesdev.org
- Hashimoto T, Wen G, Lawton M.T., Boudreau N.J, Bollen A.W., Yang G. 2003. Abnormal Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Brain Arteriovenous Malformations. *Stroke*.34:925-931.
- Hawinkels LJAC, Verspaget HW, Reijden JJ, Zon JM, Verheijen JH, Hommes DW, et al. 2009. Active TGF- β 1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Science*. April 2009. Vol. 100 no. 4. 663–670
- Hinz B. 2015. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology* 47: 54 – 65. doi: 10.1016/j.matbio.2015.05.006
- Holmes W R. Edelstein-Keshet L. 2016. Analysis of a minimal Rho-GTPase circuit regulating cell shape. *Phys. Biol.* (13) 046001
- Hsu WC, Spilker MH, Yannas IV, Rubin PAD. 2000. Inhibition of Conjunctival Scarring and Contraction by a porous Collagen-Glycosaminoglycan Implant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41: 2404-11.
- Hughes MO. 2007. A Pictorial Anatomy of the Human Eye/Anophthalmic Socket: A Review for Ocularists. *Journal of Ophthalmic Prosthetics*: 51-65
- Ito T, Ohguro H, Mamiya K, Ohguro I, Nakazawa M. 2006. Effects of Antiglaucoma Drops on MMP and TIMP Balance in Conjunctival and Subconjunctival Tissue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, March 2006, Vol. 47, No. 3: 823-30
- Ji H, Tang H, Lin H, Mao J, Gao L, Liu J, et al. 2014. Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomedical Reports* 2: 787-792. DOI: 10.3892/br.2014.323
- Jones CA. 2001. Socket surgery. In: Collin R and Rose G (Ed). *Fundamentals of Clinical Ophthalmology: Plastic and Orbital Surgery*: BMJ Books. London: 89-97.
- Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. 2004. Comprehensive Analysis of Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor Expression in Pancreatic Cancer: Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-7 Predicts Poor Survival. *Clinical Cancer Research* (10): 2832-45.
- Jope R S., Yuskaitis C J., Beurel E. 2007. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochem Res.*; 32(4-5): 577–595.
- Kapoor M, Liu S, Shi-wen X, Huh K, McCanne M, Denton CP et al. 2008. GSK-3 β in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 118 Number 10: 3279-90. <http://www.jci.org>
- Kawashima Y, Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Ohkawa K, Ohnishi Y. 1998. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human subconjunctival tissues. *Current Eye Research* 17: 445-51.

- Keeffe KS, Milman T, Rodrigues MM, Hidayat AA. 2008. Conjunctival and Corneal Pathology. In: Azar A, Blodi M.(Ed). *Principal and Practice of Ophthalmology*. Vol 3. Third Ed. Saunders. USA: 3577-608
- Kinner B, Spector M. 2001. Smooth muscle actin expression by human articular chondrocytes and their contraction of a collagen glycosaminoglycan matrix in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 19 (2): 233 – 241. doi: 10.1016/S0736-0266(00)00081-4.
- Kirby L A., Schott JT., Noble B L., Mendez D C., Caseley PS., Peterson S C., Routledge T J., Patel N V. 2012. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) Inhibitor, SB-216763, Promotes Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*. 1-12
- Krassimir A, Matthias Z, Friedrich K, Anselm J, Ursula S. 2006. Expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors, and activins in normal and scarred conjunctiva: Role of BMP-6 and activin-A in conjunctival scarring? *Experimental Eye Research*. Vol 83, 5: 1162-70.
- Kuchtey J., Kunkel J., Burgess L. G., Parks M. B., Brantley Jr M.A., Kuchtey R.W. 2014. Elevated Transforming Growth Factor β 1 in Plasma of Primary Open-Angle Glaucoma Patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. August 2014. Vol: 55 (8): 5291-7
- Kumar S, Sugandhi P, Arora R, Pandey PK. 2006. Amniotic Membrane Transplantation Versus Mucous Membrane Grafting in Anophthalmic Contracted Socket. *Orbit*: 25: 195-203.
- Kurtul BE, Erdener U, Mocan MC, Irkec M, Orhan M. 2014. Clinical and impression cytology findings of amniotic membrane and oral mucosal membrane transplantation for the management of socket contracture. *International Journal of Ophthalmology*. 7(2): 340-4
- Lee AC, Fedorovich I, Heinz GW, Kikkawa DO. 2002. Socket Reconstruction with Combined Mucous Membrane and Hard Palate Mucosal Grafts. *Ophthalmic Surg Lasers*; 33 (6).
- Lee CH, Hong CH, Yu HS, Chen GS, Yang KC. 2010. Transforming growth factor- β enhances matrix metalloproteinase-2 expression and activity through AKT in fibroblasts derived from angiomas in patients with tuberous sclerosis complex. *British Journal of Dermatology*. 2010 Dec;163(6):1238-44. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09971.x.
- Lestari AT, Dewi DS, Sadono EG. 2008. Pattern and Management of Contracted Socket in Saiful Anwar Hospital Malang: A Retrospective Study. *Kumpulan Abstrak Karya Tulis Ilmiah Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Dokter Ahli Mata Indonesia*. Makasar.
- Leung S, Chung KF. 2008. Matrix metalloproteinases in airways inflammation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: *Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation*. Ed: Vincent Lagente, Elisabeth Boichot. Birkhäuser Verlag AG. Basel, Switzerland. P: 21-37.
- Li P, Liu P, Xiong R, Chen X, Zhao Y, Lu W, et al., 2011. Ski, a modulator of wound healing and scar formation in the rat skin and rabbit ear. *Journal of Pathology*. 223: 659-71.
- Liao J.C., Lee K.T., You B.J, Lee C.L., Wen T.C., Wu Y.C., Lee H.Z.. 2015.

- Raf/ERK/Nrf2 signaling pathway and MMP-7 expression involvement in the trigonelline-mediated inhibition of hepatocarcinoma cell migration. *Food & Nutrition Research.* 59: 29884.
- Liu X, Yao Z. 2016. Chronic over-nutrition and dysregulation of GSK3 in diseases. *Molecular Endocrinology* · December 2015. 13:49.
- Mallefet P, Dweck AC. 2008. Mechanisms involved in wound healing. *The Biomedical Scientist* 7: 609-15.
- Manapov F, Müller P, Rychly J. 2005. Translocation of p21 Cip1/WAF1 from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. *Gut* 54 (6): 814 – 822. doi: 10.1136/gut.2003.036491.
- Mancinelli R, Carpino G, Petrungaro S, Mammola CL, Tomaipitinca L, Filippini A. 2017. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2017, Article ID 4629495, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/4629495>
- Manuskiatti W, Fitzpatrick RE. 2002. Treatment Response of Keloidal and Hypertrophic Sternotomy Scars. *Archives of Dermatology.* Vol. 138: 1149-55.
- Masters JR, Stacey GN. 2007. Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols.* Vol.2 No.9: 2276-84
- Mavrikakis I, Malhotra R, Shelley M.J., Sneddon K J. 2006. Surgical Management of the Severely Contracted Socket Followin Reconstruction. *Orbit:* 25: 215-9.
- Migliori M E. 2008. Enucleation, Evisceration, and Exenteration. In: Azar A, Blodi M.(Ed). *Principal and Practice of Ophthalmology.* Vol 3. Third Ed. Saunders. USA: 3519-28
- Mills S E. 2007. Histology for Pathologists, 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins.
- Monaco JL, Lawrence WT. 2003. Acute wound healing, An overview. *Clinics in Plastic Surgery* 30:1-12
- Mukhopadhyay A, Chan SY, Lim IJ, Phillips DJ, Phan TT. 2006. The role of the activin system in keloid pathogenesis. *American Journal of Physiology.* Accepted in final form 4 September 2006.
- Negmadjanov U, Holmuhamedov A, Emelyanova L, Xu H, Rizvi F, Ross GR, et al. 2016. TGF- β 1 increases resistance of NIH/3T3 fibroblasts toward apoptosis through activation of Smad2/3 and Erk1/2 pathways. *Journal Patient-Centered Research and Reviews* 3: 187 – 198. doi: 10.17294/2330-0698.1407.
- Nunery WR, Hetzler KJ. 2003. Enucleation and eviseration. In: Speath GL. *Ophthalmic surgery: Principles and practice.* Third edition. Philadelphia: Elsevier science: 501-3
- Ochiai H, Ochiai Y, Chihara E. 2001. Tranilast Inhibits TGF- β 1 Secretion without Affecting its mRNA Levels in Conjunctival Cells. *Kobe J. Med. Sci.* 47: 203-9.
- O'Connor JW, Mistry K, Detweiler D et al. 2016. Cell-cell contact and matrix adhesion promote α SMA expression during TGF β 1-induced epithelial-

- Ota T, Maeda M, Okamoto M, Tatsuka M. 2015. Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs. *BMC Systems Biology*. 9:3
- Park HJ, Ock SM, Kim HJ, Park HJ, Lee YB, Choi JM et al., 2011. Vitamin C attenuates ERK signalling to inhibit the regulation of collagen production by LL-37 in human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology*. 19: e258–e264.
- Paul J, Strickland S, Melchor JP. 2007. Fibrin deposition accelerates neovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Experimental Medicine* 204: 1999-2008.
- Peterová E, Mrkvicová A, Podmolíková L, Řezáčová M, Kanta J. 2016. The Role of Cytokines TGF- β 1 and FGF-1 in the Expression of Characteristic Markers of Rat Liver Myofibroblasts Cultured in Three-Dimensional Collagen Gel. *Physiological Research* 65: 661-672. ISSN 0862-8408 (print). ISSN 1802-9973 (online)
- Pohlers D, Brenmoehl J, Löfller I, Müller C K., Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne R W., Wolf G. 2009. Review TGF- β and fibrosis in different organs — molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1792: 746–756
- Poon R, Nik SA, Ahn J, Slade L, Alman BA. 2009. β -catenin and transforming growth factor β have distinct roles regulating fibroblast cell motility and the induction of collagen lattice contraction. *BMC Cell Biology* 2009, 10:38 doi:10.1186/1471-2121-10-38
- Poonyathalang A, Preechawat P, Pomsathit J, Mahaisaviriya P. 2005. Reconstruction of Contracted Eye Socket With Amniotic Membrane Graft. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*: 21 (5):359–62.
- Porter S. 2007. The role of the fibroblast in wound contraction and healing. *Wounds UK*. Vol 3 (1): 33-40
- Ratajczak-Wielgomas K, Gosk J., Rabczyn_ski J., Augoff K., Podhorska-Okołów,, Gamian A., Rutowski R. 2012. Expression of MMP-2, TIMP-2, TGF- β 1, and Decorin in Dupuytren's Contracture. *Connective Tissue Research*. 53(6): 469–477
- Ricardo R, Phelan K. 2008. Trypsinizing and Subculturing Mammalian Cells. *Journal of Visualized Experiments* 16: 755. Published online 2008 Jun 12. doi: [10.3791/755](https://doi.org/10.3791/755). PMCID: PMC2583029 PMID: [19066549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19066549/)
- Risinger GM Jr, Updike DL, Bullen EC, Tomasek JJ, Howard EW. 2010. TGF- β 1 suppresses the upregulation of MMP-2 by vascular smooth muscle cells in response to PDGF-BB. *American Journal Physiology. Cell Physiology*. 298(1):C191-201. doi: 10.1152/ajpcell.00417.2008. Epub 2009 Oct 21.
- Roen JL, Stasior OG. Deformities of the anophthalmic socket. 1995. In: Steward WB (Ed). *Surgery of the Eyelid, Orbit and Lacrimal System*. Vol: 3. Ophthalmology monographs 8. San Fransisco: American Academy of Ophthalmology: 32:128-32.

- Rohani MG, Parks WC. 2015. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix biology*. 44-46: 113-21
- Roy R, Yang J, Moses M.A. 2009. Matrix Metalloproteinases as Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal Of Clinical Oncology* 27:5287-97.
- Sahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Koottstorfer J, Kecht M S, Aharinejad H.S. 2011. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing. *Int. J. Care Injured.* 42: 833–837
- Saw VPJ, Dart RJC, Galatovicz G, Daniels JT, Dart JKG, Calder VL. 2009. Tumor Necrosis Factor- α in Ocular Mucous Membrane Pemphigoid and Its Effect on Conjunctival Fibroblast. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(11): 5310-7.
- Schachtrup C, Ryu JK, Helmick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, et al., 2010. Fibrinogen Triggers Astrocyte Scar Formation by Promoting the Availability of Active TGF- β after Vascular Damage. *The Journal of Neuroscience.* 30(17):5843-54
- Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N. 2009. Wnt Signaling Pathways Meet Rho GTPases. *Genes & Development.* 23:265–277.
- Schnaper H W, Hayashida T, Hubchak S.C., Poncelet A.C. 2003. TGF- β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 284: 243–52
- Serpero L, Petecchia L, Sabatini F, Giuliani M, Silvestri M, Di Blasi P, et al. 2006. The effect of transforming growth factor (TGF)- β 1 and (TGF)- β 2 on nasal polyp fibroblast activities involved upper airway remodeling: Modulation by fluticasone propionate. *Immunology letters.* 105(1), pp.61-67.
- Shao MY, Cheng R, Wang FM, Yang H, Cheng L, Hu T. 2011. β -Katenin and Rho GTPases as downstream targets of TGF- β 1 during pulp repair. *Cell Biology Internasional* 35: 105–109
- Singer AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341:738-746
- Slipicevic A. 2010. Studies of the PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways: identification of novel downstream targets involved in development and progression of melanoma. *Series of dissertations submitted.* Division of Pathology Oslo University Hospital the Norwegian Radium Hospital Faculty of Medicine University of Oslo. Oslo.
- Stahnke T, Kowtharapu BS, Stachs O et al. (2017) Suppression of TGF- β pathway by pirfenidone decreases extracellular matrix deposition in ocular fibroblasts in vitro. *PLoS ONE.* 12 (2): e0172592. doi:10.1371/journal.pone.0172592.
- Stankiewicz TR, Linseman DA. 2014. Review Article: Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Cellular Neuroscience.* October 2014. Volume 8. Article 314

- Stroneck JD, Reichert WM. Ed: Reichert WM. 2008. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. In: *Indsumuruning Neural Implant: Strategis for Contending with the In vivo Environment*. Boca Raton (FL): CRC Press
- Su WH, Cheng MH, Lee WL, Tsou TS, et. al. 2010. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Wound: Pain Relief or Excessive Scar Formation? Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume 2010, Article ID 413238, 8 pages. doi:10.1155/2010/413238.
- Sun K, Chang Y, Reed NI, Sheppard D. 2016. α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 310: L824–36
- Suojanen J. 2009. Studies on Matrix Metalloproteinase (MMP-2, -9, and -14) and β 2 Integrin Targeting as Potential Anticancer Therapeutics. *Academic Dissertation*. Faculty of Medicine of the University of Helsinki. Helsinki. P: 11-7
- Takeuchi K, Nakazawa M, Ebina Y. 2011. Effects of Trehalose on VEGF-Stimulated Angiogenesis and Myofibroblast Proliferation: Implications for Glaucoma Filtration Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52:6987–93
- Tawfik H A., Abdulhafez M H., Fouad Y A., Rashed H O., Osman W M. 2016. Revisiting the Role of the Myofibroblast in Socket Surgery: An Immunohistochemical Study. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 32: 292–5
- Telci D, Griffin M. 2006. Tissue Transglutaminase (TG2) – A Wound Response Enzyme. *Frontiers in Bioscience* 11, 867-882
- Thannickal VJ, Lee DY, White ES et al. 2003. Myofibroblast differentiation by Transforming Growth Factor-1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (14): 12384 – 12389. doi: 10.1074/jbc.M208544200.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B et al. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 3 (5): 349 – 363. doi: 10.1038/nrm809.
- Tovell V.E., Dahlmann-Noor A H, Peng T. Khaw P.T., Bailly M. 2011. Advancing the Treatment of Conjunctival Scarring: A Novel Ex Vivo Model. *Archive Ophthalmol*129(5): 619-27. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.91.
- Tyers AG, Collin JR. 2001. *Colour atlas of ophthalmic plastic surgery*. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann: 237-273.
- Ugalde A.P., Ordonez G.R., Quiros P, Puente X.S., Lopez-Otin C. 2010. Metalloproteases and the Degradome. In: *Methods in Molecular Biology: Matrix Metalloproteinase Protocols*. Ed: Ian M. Clark. Springer Science & Business Media. P: 3-29.
- Unpublished data.* Rahmaniah H., Dewi DS. 2015. Perbandingan Ekspresi Matriks Metalloproteinase-2 (MMP-2) dan Matriks Metalloproteinase-9 (MMP-9) Jaringan Tenon's Capsule Normal dan Soket Kontraktur. Bagian Mata RS Saiful Anwar / Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Unpublished data.* Wulandari M., Dewi DS. 2012. Efek RHO kinase inhibitor (Y-27632) terhadap Ekspresi α -Smooth Muscle Actin pada Kultur Jaringan Kontraktur Soket. Bagian Mata RS Saiful Anwar / Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

- Universitas Brawijaya.

Unpublished data. Suharyanto Y, Dewi DS. 2012. Aplikasi Mitomycin-C pada Operasi Rekonstruksi Soket Kontraktur. Bagian Mata RS Saiful Anwar / Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Untergasser G, Gander R, Lilg C, Lepperdinger G, Plas E, Berger P. 2005. Profiling molecular targets of TGF- β 1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. Mechanisms of ageing and development, 126(1), pp.59-69.

Vaalamo M. 2000. Matrix Metalloproteinases and Their inhibitors in normal and aberrant wound repair. Academic Dissertation. University of Helsinki.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development.* 11:2295–322

Van Buul JD, Timmermanb I. 2016. Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions. *Small GTPases.* January 2016. VOL. 0 (0); 1–11

Vasala K. 2008. Matrix Metalloproteinase Mmp-2 and Mmp-9 and Their Inhibitors Timp-1 and Timp-2 in Bladder Carcinoma. Academic Dissertation. Oulu University Press. Oulu. P: 24-34

Wakatsuki T, Kolodney MS, Zahalak GI, Elson EL. 2000. Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. *Bio-physical Journal* 79 (5): 2353 – 2368. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76481-2.

Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. 2004. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor- β . *Circulation research,* 95(3), pp.253-260.

Wearne MJ, Sandy C, Rose GE, Pitts J, Collin JRO. 2001. Autogenous Hard Palate Mucosa: the Ideal Lower Eyelid Spacer?. *British Journal Ophthalmology:* 85: 1183-7.

Webb MC. 2010. Issues in the Management of the Anophthalmic Socket: Clinical, Comfort, and Cosmetic. *Ophthalmology Rounds:* 8:1

Weinstein W.L. 2009. Identification and Localization of Matrix Metalloproteinases (MMPs) Present within The Aqueous Humor and Iridocorneal Draining Angle Tissue of Normal and Glaucomatous Canine Eyes. Thesis. The University of Georgia. P:9-25

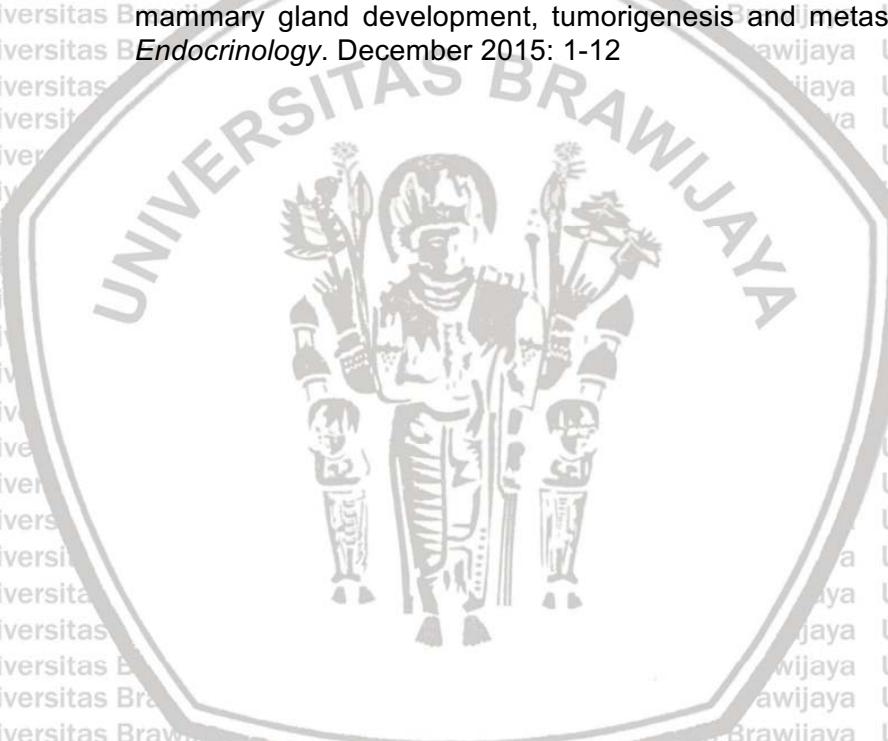
Willis BC, Borok Z. 2007. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal Physiol Lung Cell Mol Physiol* (July 13, 2007). doi:10.1152/ajplung.00163.2007

Wong S, Birrell M.A., Belvisi M.G. 2008. The role of MMPs in the inflammatory process of acute lung injury. In: *Matrix Metalloproteinases in Tissue Remodelling and Inflammation.* Ed: Vincent Lagente, Elisabeth Boichot. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. P: 1-19

Wu X, Xu X. 2016. RhoA/Rho kinase in spinal cord injury. *Neural Regeneration Research.* Jan; 11(1): 23–27. doi: 10.4103/1673-5374.169601. PMCID: PMC4774216

Wynn T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol.117(3): 524-9.

- Yamanaka O, Ikeda K, Saika S, Miyazaki K, OOshima A, Ohnishi Y. 2006. Gene transfer of Smad7 modulates injury-induced conjunctival wound healing in mice. *Molecular Vision*. 12: 841-51.
- Yun Y, Won JE, Jeon E, Lee S, Jeon E, Lee S, Kang, W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. 2010. Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *SAGE-Hindawi Access to Research Jurnal of Tissue Engineering*. Volume 2010. Article ID 218142. 18 pages
- Zhang Z., Ma J., Yao K., Yin J. 2012. Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Suppresses the Proliferation of Human Tenon's Capsule Fibroblast Proliferation Induced by Transforming Growth Factor Beta 1. *Molecular Biology*. Vol. 46. 4: 563-8
- Zorab R.A., Straus H., Denny M., Daniel J., Garret T.M. 2010. Basic and Clinical Science Course: Orbit, Eyelid and Lacrimal System. Section 7. San Francisco: American Academy of Ophthalmology: 123-33.
- Zuo Y, Oh W, Ulu A, Frost J A. 2015. Mouse models of Rho GTPase function in mammary gland development, tumorigenesis and metastasis. *Molecular Endocrinology*. December 2015: 1-12



LAMPIRAN
Lampiran 1. Analisis Perbedaan Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap GSK3**Analisis Deskriptif****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: GSK3

X	Mean	Std. Deviation	N
P0	4.6520	.39310	3
P10	2.2590	.17878	3
P20	2.9163	.04561	3
P40	3.1393	.23135	3
Total	3.2417	.93891	12

Pengujian Asumsi Normalitas Residual**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y1	.200	12	.200	.951	12	.651

a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian Asumsi Homogenitas Residual**Levene's Test of Equality of Error Variances^a**

Dependent Variable: GSK3

F	df1	df2	Sig.
3.249	3	8	.081

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X

Analisis ANOVA**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: GSK3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.213 ^a	3	3.071	50.741	.000
Intercept	126.101	1	126.101	2083.531	.000
X	9.213	3	3.071	50.741	.000
Error	.484	8	.061		
Total	135.798	12			
Corrected Total	9.697	11			

a. R Squared = .950 (Adjusted R Squared = .931)

Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc) – LSD (BNT)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GSK3

LSD

(I) X	(J) X	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P10	2.3930	.20087	.000	1.9298	2.8562
	P20	1.7357*	.20087	.000	1.2725	2.1989
	P40	1.5127*	.20087	.000	1.0495	1.9759
P10	P0	-2.3930*	.20087	.000	-2.8562	-1.9298
	P20	-.6573*	.20087	.011	-1.1205	-.1941
	P40	-.8803*	.20087	.002	-1.3435	-.4171
P20	P0	-1.7357	.20087	.000	-2.1989	-1.2725
	P10	.6573*	.20087	.011	.1941	1.1205
	P40	-.2230	.20087	.299	-.6862	.2402
P40	P0	-1.5127*	.20087	.000	-1.9759	-1.0495
	P10	.8803*	.20087	.002	.4171	1.3435
	P20	.2230	.20087	.299	-.2402	.6862

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .061.

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 2. Analisis Perbedaan Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap β Catenin

Analisis Deskriptif

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Human B-Catenin

X	Mean	Std. Deviation	N
P0	.004696	.0008476	3
P10	.003559	.0001817	3
P20	.003351	.0001234	3
P40	.003802	.0012019	3
Total	.003852	.0008301	12

Pengujian Asumsi Normalitas Residual

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y2	.256	12	.029	.885	12	.101

a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian Asumsi Homogenitas Residual

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Human B-Catenin

F	df1	df2	Sig.
7.877	3	8	.009

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X

Analisis Kruskal Walis

Ranks

	X	N	Mean Rank
Human B-Catenin	P0	3	10.33
	P10	3	6.50
	P20	3	4.50
	P40	3	4.67
	Total	12	

Test Statistics^{a,b}

	Human B-Catenin
Chi-Square	5.144
df	3
Asymp. Sig.	.162

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: X

Lampiran 3. Analisis Perbedaan Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap JNK**Analisis Deskriptif****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: JNK

X	Mean	Std. Deviation	N
P0	1.0374	.00361	3
P10	1.2691	.01790	3
P20	1.2581	.01552	3
P40	1.2202	.00205	3
Total	1.1962	.09815	12

Pengujian Asumsi Normalitas Residual**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y3	.152	12	.200*	.972	12	.928

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian Asumsi Homogenitas Residual**Levene's Test of Equality of Error Variances^a**

Dependent Variable: JNK

F	df1	df2	Sig.
6.031	3	8	.019

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X

Analisis Kruskal Walis**Ranks**

	X	N	Mean Rank
JNK	P0	3	2.00
	P10	3	9.67
	P20	3	9.33
	P40	3	5.00
	Total	12	

Test Statistics ^{a,b}	
	JNK
Chi-Square	9.359
df	3
Asymp. Sig.	.025

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: X

Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc) –Mann Whitney

Perbandingan Kontrol Negatif dengan Kontrol Positif

Perbandingan P1 dengan P2

Test Statistics ^a	
	JNK
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: X

b. Not corrected for ties.

Perbandingan P1 dengan P3

Test Statistics ^a	
	JNK
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: X

b. Not corrected for ties.

Perbandingan P1 dengan P4

Test Statistics ^a	
	JNK
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: X

b. Not corrected for ties.

Perbandingan P2 dengan P3

Test Statistics^a

	JNK
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.218
Asymp. Sig. (2-tailed)	.827
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: X

b. Not corrected for ties.

Perbandingan P2 dengan P4

Test Statistics^a

	JNK
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: X

b. Not corrected for ties.

Perbandingan P3 dengan P4

Test Statistics^a

	JNK
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: X

b. Not corrected for ties.

Lampiran 4. Analisis Perbedaan Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap MMP2**Analisis Deskriptif****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: MMP2

X	Mean	Std. Deviation	N
P0	43.5555	8.04186	3
P10	45.9937	1.29787	3
P20	47.5666	.79044	3
P40	46.7344	.89115	3
Total	45.9625	3.84284	12

Pengujian Asumsi Normalitas Residual**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y4	.253	12	.033	.827	12	.019

a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian Asumsi Homogenitas Residual**Levene's Test of Equality of Error Variances^a**

Dependent Variable: MMP2

F	df1	df2	Sig.
10.395	3	8	.004

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X

Analisis Kruskal Walis**Ranks**

Unive	X	N	Mean Rank
MMP2	P0	3	7.00
	P10	3	4.33
	P20	3	8.67
	P40	3	6.00
	Total	12	

Test Statistics^{a,b}

	MMP2
Chi-Square	2.282
df	3
Asymp. Sig.	.516

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: X

Lampiran 5. Analisis Perbedaan Pengaruh Dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTP ase**Analisis Deskriptif****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: RND

X	Mean	Std. Deviation	N
P0	.1423	.02790	3
P10	.1506	.01113	3
P20	.1562	.00807	3
P40	.1794	.02230	3
Total	.1571	.02176	12

Pengujian Asumsi Normalitas Residual**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y5	.142	12	.200*	.977	12	.967

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Pengujian Asumsi Homogenitas Residual**Levene's Test of Equality of Error Variances^a**

Dependent Variable: RND

F	df1	df2	Sig.
2.645	3	8	.121

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X

Analisis ANOVA**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: RND

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002 ^a	3	.001	2.075	.182
Intercept	.296	1	.296	808.895	.000
X	.002	3	.001	2.075	.182
Error	.003	8	.000		
Total	.301	12			
Corrected Total	.005	11			

a. R Squared = .438 (Adjusted R Squared = .227)

Lampiran 6. Analisis Hubungan Dosis TGF- β 1 terhadap GSK3**Asumsi Normalitas Data****Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
X1	.266	9	.066	.794	9	.017
GSK3	.277	9	.045	.927	9	.458

a. Lilliefors Significance Correction

Analisis Korelasi Pearson**Correlations**

			X1	GSK3
Spearman's rho	X1	Correlation Coefficient	1.000	.900
		Sig. (2-tailed)	.	.001
		N	9	9
	GSK3	Correlation Coefficient	.900**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.001	.
		N	9	9

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 7. Analisis Hubungan Dosis TGF- β 1 terhadap β Catenin**Asumsi Normalitas Data****Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
X1	.266	9	.066	.794	9	.017
Human B-Catenin	.331	9	.005	.701	9	.001

a. Lilliefors Significance Correction

Analisis Korelasi Rank Spearman**Correlations**

		X1	Human B-Catenin	
Spearman's rho	X1	Correlation Coefficient	1.000	-.399
		Sig. (2-tailed)	.	.288
		N	9	9
	Human B-Catenin	Correlation Coefficient	-.399	1.000
		Sig. (2-tailed)	.288	.
		N	9	9

Lampiran 8. Analisis Hubungan Dosis TGF- β 1 terhadap JNK**Asumsi Normalitas Data****Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
X1	.266	9	.066	.794	9	.017
JNK	.195	9	.200	.920	9	.389

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Analisis Korelasi Rank Spearman**Correlations**

		X1	JNK
X1	Pearson Correlation	1	-.876**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	9	9
JNK	Pearson Correlation	-.876**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	N	9	9

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 9. Analisis Hubungan Dosis TGF- β 1 terhadap MMP2**Asumsi Normalitas Data**

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
X1	.266	9	.066	.794	9	.017
MMP2	.207	9	.200	.948	9	.663

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Analisis Korelasi Rank Spearman

Correlations		
	X1	MMP2
X1 Pearson Correlation	1	.181
Sig. (2-tailed)		.642
N	9	9
MMP2 Pearson Correlation	.181	1
Sig. (2-tailed)	.642	
N	9	9

Lampiran 10. Analisis Hubungan Dosis TGF- β 1 terhadap RHO-GTPase

Asumsi Normalitas Data

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
X1	.266	9	.066	.794	9	.017
RND	.212	9	.200	.884	9	.172

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Analisis Korelasi Pearson

		Correlations	
		X1	RND
X1	Pearson Correlation	1	.702
	Sig. (2-tailed)		.035
	N	9	9
RND	Pearson Correlation	.702*	1
	Sig. (2-tailed)	.035	
	N	9	9

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 11. Analisis PLS**Path Coefficients (Mean, STDEV, T-Values)**

	Original Sample (O)	Sample Mean (M)	Standard Deviation (STDEV)	Standard Error (STERR)	T Statistics (O/STERR)
GSK3 -> Human B-Catenin	-0.023447	-0.145929	0.240484	0.240484	0.097500
Human B-Catenin -> MMP2	-0.423281	-0.426154	0.099055	0.099055	4.273207
Human B-Catenin -> Myo Fibrosis	-0.359048	-0.319109	0.141933	0.141933	2.529701
JNK -> Human B-Catenin	0.942896	0.891333	0.332361	0.332361	2.836965
RHO-GTP ase -> Human B-Catenin	1.511088	1.299052	0.582177	0.582177	2.595582
TGF Beta 1 -> GSK3	0.836275	0.804832	0.066950	0.066950	12.491079
TGF Beta 1 -> JNK	-0.875544	-0.863922	0.043864	0.043864	19.960473
TGF Beta 1 -> RHO-GTP ase	0.702319	0.701099	0.072343	0.072343	9.708178

R Square

	R Square
GSK3	0.699355
Human B-Catenin	0.849382
JNK	0.766578
MMP2	0.179167
Myo Fibrosis	0.128915
RHO-GTP ase	0.493252
TGF Beta 1	

Lampiran 12. Pengujian Indirect Effect

Eksogen	Mediasi 1	Mediasi 2	Endogen	Indirect Coefficient	Standard Error	T Statistics
X	Y1		Y4	1.061	0.423	2.508
X	Y2		Y4	1.264	0.497	2.541
X	Y3		Y4	-1.323	0.514	2.574
X	Y1	Y4	Y5	-0.381	0.214	1.781
X	Y2	Y4	Y5	-0.454	0.253	1.793
X	Y3	Y4	Y5	0.475	0.263	1.804
X	Y1	Y4	Y6	-0.449	0.105	4.273
X	Y2	Y4	Y6	-0.535	0.245	2.184
X	Y3	Y4	Y6	0.560	0.254	2.205
Y1	Y4		Y5	-0.543	0.299	1.812
Y1	Y4		Y6	-0.640	0.288	2.218
Y2	Y4		Y5	0.008	0.086	0.097
Y2	Y4		Y6	0.010	0.102	0.097
Y3	Y4		Y5	-0.339	0.179	1.888
Y3	Y4		Y6	-0.399	0.169	2.364

Eksogen	Mediasi 1	Mediasi 2	Endogen	Path Coefficient	Indirect Coefficient	Total Coefficient
X			Y1	0.702	0.702	0.702
X			Y2	0.836	0.836	0.836
X			Y3	-0.876	-0.876	-0.876
X	Y1		Y4		1.061	1.061
X	Y2		Y4		1.264	1.002
X	Y3		Y4		-1.323	-1.323
X	Y1	Y4	Y5		-0.381	-0.381
X	Y2	Y4	Y5		-0.454	-0.360
X	Y3	Y4	Y5		0.475	0.475
X	Y1	Y4	Y6		-0.449	-0.449
X	Y2	Y4	Y6		-0.535	-0.424
X	Y3	Y4	Y6		0.560	0.560
Y1			Y4	1.511	1.511	1.511
Y1	Y4		Y5		-0.543	-0.543
Y1	Y4		Y6		-0.640	-0.640
Y2			Y4	-0.023	-0.023	-0.023
Y2	Y4		Y5		0.008	0.008
Y2	Y4		Y6		0.010	0.010
Y3			Y4	0.943	0.943	0.943
Y3	Y4		Y5		-0.339	-0.339
Y4			Y6	-0.359	-0.359	-0.359
Y4			Y6	-0.423	-0.423	-0.423

