

**PENGARUH JUMLAH SUBKULTUR TERHADAP TINGKAT EKSPRESI α -SMA
PADA JARINGAN SOKET KONTRAKTUR ORBITA**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:

Elsa Safira Chaerinnisa

NIM: 145070101111009

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2017

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH JUMLAH SUBKULTUR TERHADAP TINGKAT EKSPRESI
 α -SMA PADA JARINGAN SOKET KONTRAKTUR ORBITA**

Oleh:

Elsa Safira Chaerinnisa

NIM: 145070101111009

Telah diuji pada

Hari: Jumat

Tanggal: 8 Desember 2017

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Elly Mayangsari, M.Biomed

NIP: 19840516 2009121005

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Debby Shintya Dewi, Sp.M (K)

NIP: 197305202009042001

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

NIP: 196701231996011001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)

NIP: 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Elsa Safira Chaerinnisa

NIM : 145070101111009

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 4 Desember 2017

Yang membuat pernyataan,

(Elsa Safira Chaerinnisa)

NIM: 145070101111009

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi hidayah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul, "Pengaruh Jumlah Subkultur terhadap Tingkat Ekspresi α -SMA pada Jaringan Soket Kontraktur Orbita".

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. dr. Debby Shintya Dewi, Sp.M (K) sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bantuan bimbingan untuk bisa berdiskusi dan belajar lebih baik, telah mempersiapkan seluruh bahan penelitian, serta senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini
2. dr. Hidayat Sujuti, M.Sc, Ph.D, Sp.M sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing ketika penulis mengalami kesulitan dan terus memberikan semangat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. dr. Elly Mayangsari, M.Biomed sebagai Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan semangat untuk menyelesaikan Tugas Akhir.
4. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K) sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
7. Para Analis di LSIH yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Yang tercinta ibunda Chaerita Maulani dan ayahanda Ady Sutjahjono, adik-adik Alvin, Nabila, dan Rafli, Umi Tri Neptunus, serta Akung Madrai atas segala pengertian, doa, dan kasih sayang yang tidak pernah putus.
9. Rekan setia penulis, Rosalina, Justicia, Tavia, Rozah, Hasna, Riz'q Threevisca, dan rekan-rekan dekat yang telah bersama membantu memotivasi penulis untuk segera menyelesaikan Tugas Akhir.
10. Kak Shelby A. Ernanda yang telah sangat membantu mengajarkan ilmu statistika untuk tugas akhir ini, teman penelitian penulis, Wahyu D.N., atas kerja samanya sebagai tim, serta teman-teman PS.Ked 2014 yang telah membantu dan memberi banyak dukungan dalam berbagai hal.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 4 Desember 2017

Penulis

ABSTRAK

Chaerinnisa, Elsa S.. 2017. ***Pengaruh Jumlah Subkultur terhadap Tingkat Ekspresi α -SMA pada Jaringan Soket Kontraktur Orbita***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Debby Shintya Dewi, Sp.M(K) (2) dr. Hidayat Sujuti, M.Sc, Ph.D, Sp.M

Pada beberapa pasien dengan soket anoftalmia, soket kontraktur adalah masalah serius yang mengganggu pemasangan prostesa mata. Perjalanan kontraktur ini tidak lepas dari proses *wound healing* yang di dalamnya terdapat peran dari *growth factor* dan sel fibrotik seperti myofibroblas. Dalam penelitian, perkiraan jumlah myofibroblas diketahui dari tingkat ekspresi *fiber* kontraktalnya, yaitu α -SMA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat ekspresi α -SMA setelah dilakukan subkultur tiga kali dari jaringan pasien yang mengalami soket kontraktur, terutama untuk mengetahui peran subkultur dan lingkungan pro-fibrotik pada jaringan terhadap perubahan jumlah myofibroblas yang diamati dari perubahan tingkat ekspresi α -SMA. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan model *in vitro*. Sampel diambil dari pasien soket kontraktur derajat 4, kemudian dilakukan kultur primer serta subkultur satu, dua, dan tiga. Setelah itu dilakukan pemberian TGF- β pada salah satu *well* dari masing-masing subkultur sebagai kelompok kontrol yang tetap memberikan lingkungan pro-fibrotik, dan kemudian setelah pemberian antibodi anti- α -SMA, pemeriksaan *immunofluorescence* dilakukan. Hasil analisis statistik menunjukkan peningkatan tingkat ekspresi α -SMA yang signifikan pada kelompok subkultur 3, sementara pada kelompok kontrol justru mengalami penurunan pada subkultur 3. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa subkultur sebanyak dua kali dari kultur primer belum menunjukkan perubahan tingkat ekspresi α -SMA yang signifikan, sedangkan subkultur sebanyak tiga kali dari kultur primer mampu menunjukkan perubahan yang signifikan pada biakan jaringan soket kontraktur orbita. Selain itu, TGF- β dalam dosis 10ng/mL kurang berpengaruh dalam peningkatan tingkat ekspresi α -SMA pada subkultur yang dilakukan tiga kali jika dibandingkan dengan subkultur tanpa TGF- β , sehingga kemungkinan terdapat peran *growth factor* lain yang mempengaruhi pertumbuhan myofibroblas di luar jaringan soket kontraktur orbita.

Kata kunci: α -SMA, TGF- β , subkultur, soket kontraktur, myofibroblas

ABSTRACT

Chaerinnisa, Elsa S.. 2017. ***The Effect of Subculture Amount to the Expression of α -SMA in Orbital Socket Contracture***. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors: (1) dr. Debby Shintya Dewi, Sp.M(K) (2) dr. Hidayat Sujuti, M.Sc, Ph.D, Sp.M

In some patients with anophthalmic sockets, socket contracture is a serious problem that disrupts the installation of eye prosthesis. Contracture formation can not be separated from the healing process in which there is a role of growth factors and fibrotic cells such as myofibroblast. From previous studies, the number of myofibroblasts is known from the expression of the contractile fibers, that is α -SMA. This study was intended to determine the level of α -SMA after three-times subculture from patients with contracted socket tissue, that is to know the role of subculture and pro-fibrotic environment toward changes in the number of myofibroblast observed from the changes of α -SMA expression. This research is an experimental research with in vitro model. The sample was taken from a patient with 4th degree socket contracture, then the primary culture was done and continued with subculture one, two, and three. TGF- β was added to either of each subculture as a control group that would still provide a pro-fibrotic environment, and then after administration of anti- α -SMA antibody, immunofluorescence examination was performed. The result of statistical analysis showed a significant increase of α -SMA expression in subculture group 3, while in the control group subculture 3 showed a marked decrease of α -SMA expression. From this result, it can be concluded that subculture twice from primary culture has not showed significant change of α -SMA expression, whereas subculture three times of primary culture indicated a significant change in α -SMA expression. In addition, TGF- β in doses of 10ng/mL gives less effect toward reduction of α -SMA expression when compared to subcultures without TGF- β , so there is likely a role another growth factor that affects myofibroblasts growth outside the tissue of orbital socket contracture.

Keywords: α -SMA, TGF- β , subculture, passage, socket contracture, myofibroblast

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Pernyataan Keaslian.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Bagi Peneliti.....	4
1.4.2 Bagi Masyarakat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Orbita	5
2.2 Soket Anoftalmia	6

2.3 Soket Kontraktur.....	7
2.4 Penyembuhan Luka (<i>Wound Healing</i>).....	10
2.4.1 Fisiologis.....	10
2.4.1.1 Peran <i>Growth Factor</i>	12
2.4.1.2 Peran Fibroblas, Proto-myofibroblas, dan Myofibroblas.....	12
2.4.1.3 Alfa-SMA	16
2.4.2 Patologis.....	17
2.5 Subkultur (<i>Passage</i>).....	18
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konsep.....	20
3.2 Hipotesis Penelitian.....	21
BAB IV METODE PENELITIAN	22
4.1 Desain Penelitian	22
4.2 Sampel Penelitian	22
4.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	23
4.4.1 Kriteria Inklusi	23
4.4.2 Kriteria Eksklusi	23
4.5 Variabel Penelitian	23
4.6 Definisi Operasional	23
4.7 Alat dan Bahan.....	24
4.7.1 Alat:	24
4.7.2 Bahan Penelitian:.....	25
4.8 Alur Penelitian	25
4.9 Perlakuan:.....	26

4.10	Prosedur Penelitian	26
4.10.1	Pengambilan Sampel.....	26
4.10.2	Kultur dan Subkultur	27
4.10.3	Pemeriksaan Tingkat Ekspresi α -SMA Menggunakan Immuno- fluorescence	28
4.11	Analisis Data	30
4.12	Etika Penelitian.....	30
BAB V	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	31
5.1	Hasil Penelitian.....	31
5.2	Analisis Data	33
BAB VI	PEMBAHASAN	38
6.1	Hubungan Jumlah Subkultur dengan Tingkat Ekspresi α -SMA.....	38
6.2	Hubungan Jumlah Subkultur dengan Perubahan Myofibroblas menjadi Bentuk Inaktifnya (Fibroblas).....	39
6.3	Hubungan Pemberian TGF- β dengan Tingkat Ekspresi α -SMA	40
6.4	Hubungan Tingkat Ekspresi α -SMA antara Subkultur tanpa <i>Growth Factor</i> dengan Subkultur dengan TGF- β 10ng/mL	41
6.5	Keterbatasan Penelitian	42
BAB VII	PENUTUP	43
7.1	Kesimpulan	43
7.2	Saran	44
7.2.1	Bagi peneliti selanjutnya	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Gambar 5.1.....	31
Gambar 5.2.....	32
Gambar 5.3.....	36
Gambar 5.4.....	37
Gambar 5.5.....	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.....	6
Gambar 2.2.....	6
Gambar 2.3.....	7
Gambar 2.4.....	8
Gambar 2.5.....	9
Gambar 2.6.....	11
Gambar 2.7.....	13
Gambar 2.8.....	14
Gambar 2.9.....	15
Gambar 2.10.....	17
Gambar 5.1.....	32
Gambar 5.2.....	33
Gambar 5.3.....	34
Gambar 5.4.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

Hasil Uji Analisis Kelompok Perlakuan.....	47
Uji Normalitas.....	47
Uji <i>Kruskal-Wallis</i>	47
Uji <i>Mann-Whitney</i>	47
Subkultur 1 dengan 2.....	47
Subkultur 1 dengan 3.....	47
Subkultur 2 dengan 3.....	47
Hasil Uji Analisis Kelompok Kontrol	48
Uji Normalitas.....	48
Uji Homogenitas.....	48
Uji <i>ANOVA</i>	48
Uji <i>Post-hoc Tukey HSD</i>	48
Hasil Uji Analisis <i>Independent T-test</i>	49
Subkultur 1 antar Kelompok	49
Subkultur 2 antar Kelompok	49
Subkultur 3 antar Kelompok	49

DAFTAR SINGKATAN

1. α -SMA *Alpha Smooth Muscle Actin*
2. TGF- β *Transforming Growth Factor – Beta*
3. ECM *Extracellular Matrix*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mata adalah organ yang penting pada tubuh manusia, dengan fungsinya sebagai salah satu dari panca indera dan juga sebagai objek keindahan wajah manusia. Kelainan yang terjadi pada organ ini, selain membuat berkurang atau hilangnya kemampuan penglihatan, akan mengurangi keindahan wajah seseorang. Sebagai contoh, adanya keganasan atau trauma menyebabkan perlunya tindakan enukleasi, sehingga akan tersisa rongga orbita tanpa adanya bola mata. Hal ini disebut soket anoftalmia. Pada soket anoftalmia, pemasangan mata palsu atau prostesa dapat dilakukan agar penampilan mata seseorang tampak seperti normal. Namun pemasangan prostesa menjadi sulit pada keadaan tertentu, yaitu pada kondisi soket kontraktur (Adhikari *et.al.*, 2007 dan bin Jamayet *et.al.*, 2015).

Soket kontraktur adalah keadaan yang ditandai dengan hilangnya fornix dengan pembentukan skar atau jaringan parut dan adanya jaringan granulasi. Kontraktur ini dapat terjadi sejak beberapa minggu hingga tahun setelah enukleasi, dan dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti fibrosis akibat trauma, teknik operasi yang salah sehingga terjadi diseksi berlebihan dari konjungtiva atau kapsula Tenon, atau tindakan enukleasi itu sendiri (Tawfik *et.al.*, 2009 dan Kurtul, 2014). Fibrosis yang terjadi juga dapat disebabkan oleh infeksi kronis, ekstrusi implan, atau kegagalan penempatan prostesa (Poonyathalang *et.al.*, 2005). Soket

kontraktur sendiri terbagi menjadi beberapa *grade*, dengan masing-masing *grade* menentukan tatalaksana yang berbeda (Tawfik *et.al.*, 2009).

Studi di India menunjukkan kejadian soket kontraktur pada 7,7% kasus anoftalmia, dengan penyebab didapat sebesar 5,9% dan kongenital sebesar 1,8%. Sebagian besar dari kasus yang didapat, sebanyak 58,8% disebabkan oleh infeksi, kesalahan teknik enukleasi, atau pemasangan protesa yang salah (Adhikari *et.al.*, 2007). Sedangkan prevalensi kasus kelahiran dengan anoftalmia adalah sebesar 0,3 per 100,000 kelahiran (Soll, 1982).

Pada pasien soket anoftalmia, keadaan soket kontraktur bukanlah masalah yang tidak wajar. Soket yang berkontraksi dan pemendekan fornix pada orbit tanpa mata dapat mengarah pada sempitnya ruang untuk meletakkan protesa (Poonyathalang *et.al.*, 2005). Perubahan dinamika metabolisme dan sirkulasi pada soket anoftalmia menuju soket kontraktur terjadi karena orbit yang ada sudah tidak memiliki suplai darah dan fungsi metabolik yang normal. Pasien biasanya datang dengan protesis yang terpasang tidak sempurna, atau justru tidak bisa terpasang (Soll, 1982, Petrelli, 1982, dan Kurtul, 2014).

Sementara itu, patogenesis soket kontraktur masih belum dapat dipahami secara menyeluruh. Pada dasarnya, keadaan kontraktur adalah hasil akhir dari proses penyembuhan luka yang tidak berjalan sebagaimana mestinya. Sel-sel yang bertanggung jawab dalam menyebabkan fibrosis atau skar pada fase akhir penyembuhan luka, seperti sel myofibroblas, gagal mengalami apoptosis sehingga terjadi fibrosis berlebih. Hal ini diperparah dengan respon timbal-balik positif dari tubuh pada keadaan jaringan dengan kekakuan yang tinggi, yaitu pada keadaan kontraktur. Myofibroblas sendiri mendapatkan sifat kontraktilitas dari tingginya

kadar *stress fiber* α -SMA, sehingga tingkat ekspresi *stress fiber* ini dapat diteliti untuk mengetahui banyaknya myofibroblas dalam jaringan soket kontraktur (Tomasek *et.al.*, 2002, Meyer-ter-Vehn *et.al.*, 2006, dan Darby *et.al.*, 2014).

Untuk mengatasi soket kontraktur, diperlukan operasi rekonstruksi dengan tujuan membentuk fornix yang dalam dan memperluas permukaan konjungtiva. Rekonstruksi ini membutuhkan rongga dengan bentuk dan ukuran yang cukup. Langkah pertama yang harus dilakukan adalah mengisi rongga orbita yang kosong dengan menggunakan jaringan lunak (*implant*), kemudian membentuk fornix yang adekuat menggunakan *graft* (Tawfik *et.al.*, 2009 dan Kurtul, 2014).

Namun, penanganan soket kontraktur secara umum ternyata belum memiliki protokol atau algoritma yang terstandarisasi. Proses rekonstruksi yang berhubungan dengan osteotomi dan *free-flap* pun ternyata memakan banyak waktu, sulit dikuasai, dan membutuhkan lebih dari satu tim pembedahan. Fasilitas untuk melakukan pendekatan multidisiplin ini bisa jadi tidak tersedia di semua pusat kesehatan. Selain itu, rekonstruksi fornix membutuhkan *graft* yang biasanya didapat dari mukosa bukal, mukosa nasal, septum nasal, atau palatum mole. Namun, *graft* dari jaringan-jaringan ini memiliki jumlah yang sedikit, menambah jam operasi, dan membuat rasa tidak nyaman pada lokasi donor (Poonyathalang *et.al.*, 2005 dan Tawfik *et.al.*, 2009). Untuk itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui patofisiologi soket kontraktur agar dapat menekan angka kejadian soket kontraktur dan membantu menemukan penatalaksanaan yang tepat sesuai dengan perjalanan penyakit ini.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh jumlah subkultur terhadap tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan soket kontraktur orbita?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh jumlah subkultur terhadap tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan soket kontraktur orbita.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Mengetahui pengaruh jumlah subkultur sebanyak tiga kali terhadap tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan soket kontraktur orbita.
- Mengetahui hubungan antara kelompok perlakuan subkultur dengan kelompok kontrol dengan pemberian TGF- β ditinjau dari tingkat ekspresi α -SMA

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat membantu peneliti mempelajari lebih lanjut patogenesis soket kontraktur orbita secara biomolekuler, sehingga dapat meningkatkan pengetahuan peneliti untuk diaplikasikan dalam klinik.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat mencegah terjadinya soket kontraktur orbita sehingga mengurangi biaya tindakan rekonstruksi soket berulang, dan meminimalkan keresahan pasien akibat protesa yang tidak bisa terpasang.

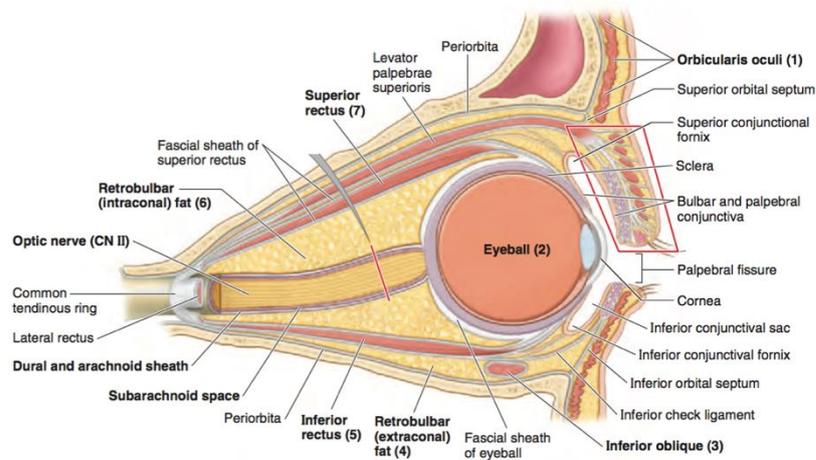
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Orbita

Regio orbita adalah daerah pada wajah di atas orbit dan bola mata, melingkupi kelopak mata atas, bawah, dan *lacrimal apparatus*. Sedangkan orbit adalah rongga tulang bilateral pada skeleton wajah yang membentuk rongga piramid quadrangular dengan basis ke arah anterolateral dan apex ke arah posteromedial. Rongga orbita berisikan:

- kelopak mata, yang menutup orbit di bagian depan, mengontrol paparan bola mata bagian depan;
- otot ekstra-okuli, yang memposisikan bola mata dan mengangkat kelopak mata atas;
- serabut syaraf dan pembuluh darah menuju bola mata dan otot-ototnya;
- *orbital fascia* yang melingkupi di sekitar bola mata dan otot-ototnya;
- membran mukosa (konjungtiva) yang melapisi kelopak mata dan bola mata bagian depan;
- *lacrimal apparatus* yang memberi lubrikasi; dan
- lemak orbita (Moore, 2014)



Gambar 2.1 Anatomi mata potongan sagital, dilihat dari lateral (Moore, 2014).

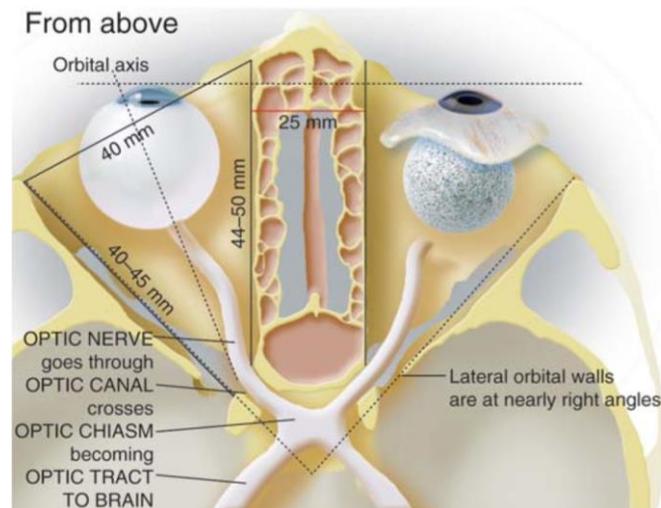
2.2 Soket Anoftalmia

Soket anoftalmia atau anoftalmia adalah keadaan tidak adanya bola mata di dalam rongga orbita. Kecelakaan, penyakit, atau kondisi yang memerlukan tindakan enukleasi dapat menyebabkan kondisi anoftalmia. Anoftalmia sangat mempengaruhi kondisi psikis pasien, sehingga tujuan utama operasi soket adalah dapat menempatkan prostesa yang menyerupai mata normal sebelah lainnya semirip mungkin (Smith *et.al.*, 2008, dan Tawfik *et.al.*, 2009).



Gambar 2.2 Soket anoftalmia (mata kiri) sebelum (atas) dan setelah (bawah) pemasangan prostesa (Hughes, 2007).

Dua masalah utama yang harus diatasi pada soket anoftalmia adalah hilangnya volume rongga orbita, yang dapat diatasi dengan penempatan implan, dan memastikan adanya fornix yang adekuat untuk menompang prostesa, yaitu fornix inferior yang dalam dan sehat (Smith *et.al.*, 2008).



Gambar 2.3 Mata normal (kiri) dan soket anoftalmia dengan prostesa serta implan (kanan) (Hughes, 2007).

2.3 Soket Kontraktur

Soket kontraktur adalah kondisi yang terjadi pada soket anoftalmia. Soket kontraktur ditandai dengan hilangnya fornix dengan pembentukan skar atau jaringan parut dan adanya jaringan granulasi. Secara histopatologis, pada soket kontraktur dapat dilihat adanya infiltrasi sel inflamasi, metaplasia epitel konjungtiva, penurunan densitas sel goblet, dan peningkatan keratinisasi. Pada soket kontraktur juga terjadi atrofi lemak orbita, yang kemungkinan besar disebabkan oleh berkurangnya sirkulasi dan menurunnya kebutuhan metabolik soket anoftalmia. Hubungan dan sokongan otot levator juga terganggu pada orbit yang telah dilakukan enukleasi, dan biasanya juga didapati adanya ptosis (Soll, 1982, dan Kurtul, 2014). Soket kontraktur ini bukanlah masalah yang asing bagi

pasien soket anoftalmia, dan utamanya dapat menyebabkan pasien datang dengan keadaan prostesa mata yang tidak terpasang dengan tepat atau tidak dapat menggunakan prostesa sama sekali (Petrelli, 1982, dan Kurtul, 2014).

Sementara itu, patogenesis soket kontraktur belum dapat dipahami secara menyeluruh. Soket kontraktur sendiri dapat terjadi setelah fibrosis karena trauma, inflamasi kronis, infeksi atau penyakit sikatriks konjungtiva, teknik operasi yang salah sehingga terjadi diseksi berlebihan dari konjungtiva atau kapsula Tenon, prosedur berulang pada soket anoftalmia, luka bakar akibat zat alkali, iradiasi, atau tindakan enukleasi. Dalam jangka panjang, infeksi kronis dan inflamasi menjadi penyebab tersering dari soket kontraktur. Fibrosis yang terjadi juga dapat disebabkan oleh ekstrusi implan atau kegagalan penempatan prostesa (Poonyathalang *et.al.*, 2005, Tawfik *et.al.*, 2009, dan Kurtul, 2014).

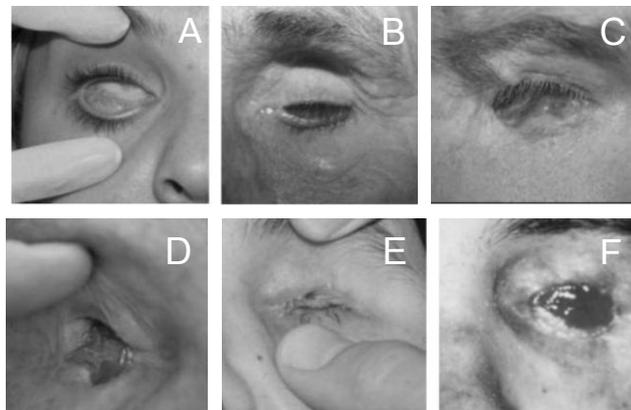


Gambar 2.4 Soket kontraktur mata kanan (Mavrikakis, 2006).

Soket kontraktur sendiri terbagi menjadi beberapa derajat, dengan masing-masing derajat menentukan tatalaksana yang berbeda. Derajat tersebut terbagi menjadi beberapa kategori:

- **Derajat 0:** Soket memiliki konjungtiva yang sehat, fornix yang dalam dan terbentuk dengan baik (Gambar 4 A)

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



Gambar 2.5 Derajat soket kontraktur: Derajat 0 (A), Derajat 1 (B), Derajat 2 (C), Derajat 3 (D), Derajat 4 (E), Derajat 5 (F) (Webb, 2010)

Untuk mengatasi soket kontraktur, diperlukan operasi rekonstruksi dengan tujuan membentuk fornix yang dalam dan memperluas permukaan konjungtiva. Rekonstruksi ini membutuhkan rongga dengan bentuk dan ukuran yang cukup.

Namun, penanganan soket kontraktur secara umum ternyata belum memiliki protokol atau algoritma yang terstandardisasi. Proses rekonstruksi yang berhubungan dengan osteotomi dan *free-flap* pun ternyata memakan banyak waktu, sulit dikuasai, dan membutuhkan lebih dari satu tim pembedahan. Fasilitas untuk melakukan pendekatan multidisiplin ini bisa jadi tidak tersedia di semua pusat kesehatan. Selain itu, rekonstruksi fornix membutuhkan *graft* yang biasanya didapat dari mukosa bukal, mukosa nasal, septum nasal, atau palatum mole. Namun, *graft* dari jaringan-jaringan ini memiliki jumlah yang sedikit, menambah jam operasi, dan ketidaknyamanan pada lokasi donor. Kerjasama antara pasien, dokter mata, dan juga okularis pun sangat diperlukan untuk menyesuaikan prostesa yang dibutuhkan (Poonyathalang *et.al.*, 2005, Tawfik *et.al.*, 2009, dan Webb, 2010).

2.4 Penyembuhan Luka (*Wound Healing*)

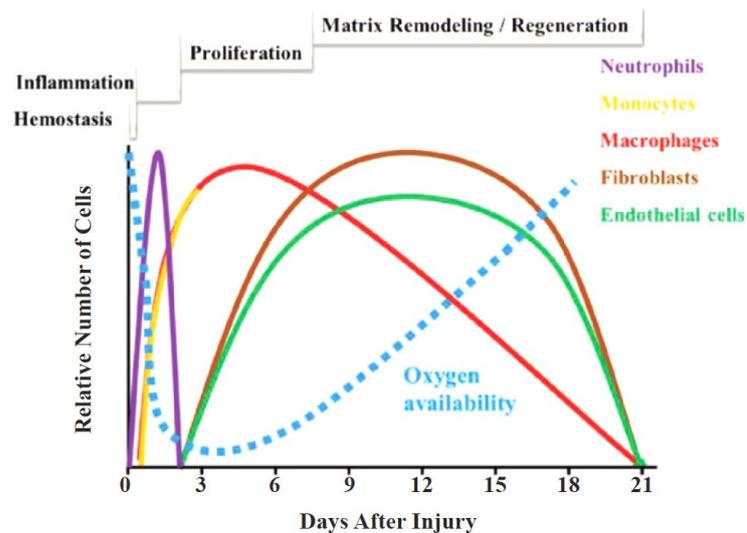
2.4.1 Fisiologis

Setelah luka akut, jaringan yang terluka mengalami empat tahap perbaikan yang berusaha mengembalikan jaringan tersebut pada keadaan sebelum terluka. Empat tahap yang dimaksud yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi sel (termasuk fibroblas), serta sintesis matriks ekstraseluler/pembentukan skar dan *remodeling*, dengan jangka waktu masing-masing yang bervariasi sesuai dengan keparahan luka dan adanya faktor yang memperparah luka (seperti infeksi) (Czubryt, 2012).

Fase awal dari proses penyembuhan luka ditandai dengan ruptur platelet dan degranulasi sel mast setempat, yang kemudian diikuti pembentukan benang-benang fibrin, sehingga menyebabkan pembekuan darah. Makrofag juga berperan pada fase inflamasi hingga regenerasi jaringan dan menghasilkan *growth factor* dalam jumlah besar. Dalam pengaruh *growth factor* ini, jumlah myofibroblas

bertambah banyak pada saat fase kedua (proliferasi) dimulai, termasuk di dalamnya proses angiogenesis, proliferasi sel fibroblas, serta remodeling dan pembentukan skar. Myofibroblas menghasilkan komponen matriks ekstraseluler (ECM) dan menggunakan kemampuan kontraksinya untuk membantu penutupan luka (Koh *et.al.*, 2011, Czubryt, 2012, Darby *et.al.*, 2014, dan Falke *et.al.*, 2015).

Selanjutnya dalam proses remodeling ini, enzim proteolitik *matrix metalloproteinase* (MMP) dan inhibitorynya (*tissue inhibitor of metalloproteinases* [TIMP]) berperan penting, dengan peran MMP utamanya yaitu menurunkan produksi ECM serta degradasi matrix. Secara bertahap, kolagen tipe III yang menjadi penyusun utama jaringan granulasi digantikan oleh kolagen tipe I yang merupakan komponen utama dermis. Akhirnya, elastin yang berperan untuk elastisitas jaringan akan muncul kembali. Pada fase resolusi, jumlah sel menjadi amat jauh berkurang dengan mekanisme apoptosis sel pembuluh darah dan sel myofibroblas (Darby *et.al.*, 2014).



Gambar 2.6 Skema fase penyembuhan luka (Kimmel *et.al.*, 2016).

2.4.1.1 Peran Growth Factor

Sitokin dan *growth factors* (seperti *transforming growth factor* [TGF]- β , *fibroblast growth factor* [FGF], *vascular endothelial growth factor* [VEGF], *epidermal growth factor*, *connective tissue growth factor*, dan *platelet-derived growth factor* [PDGF]) yang juga dilepaskan oleh platelet berperan pada: fase proliferasi (termasuk proliferasi sel fibroblas); fase inflamasi, yaitu saat pemanggilan sel-sel inflamasi menuju daerah luka; pada fase fibrosis/pembentukan skar. Makrofag juga memproduksi *growth factor* dalam jumlah besar, seperti *pro-epidermal growth factor* dan juga TGF- β yang memicu proliferasi sel dan sintesis ECM. Sedangkan pengaruh *growth factor* terhadap myofibroblas yaitu menstimulasi tingkat *survival* sel tersebut melalui konsentrasi lokal TGF- β 1 dan endothelin-1 via aktivasi protein kinase B (AKT) (Czubryt, 2012, Darby *et.al.*, 2014, dan Falke *et.al.*, 2015).

2.4.1.2 Peran Fibroblas, Proto-myofibroblas, dan Myofibroblas

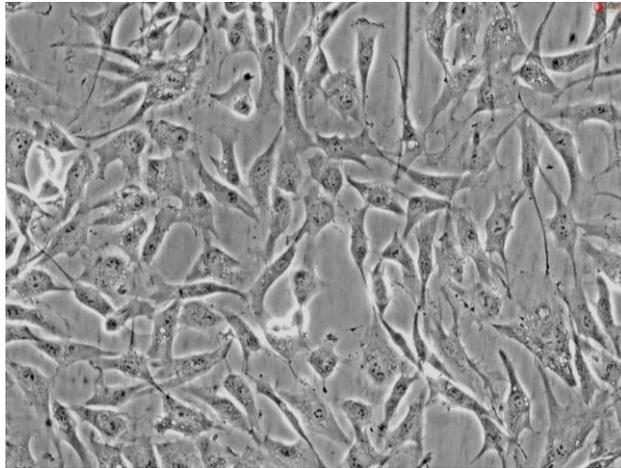
2.4.1.2.1 Fibroblas

2.4.1.2.1.1 Karakteristik

Seperti sel jaringan ikat lainnya, fibroblas berasal dari mesenkim primitif. Fibrosit (inaktif) berukuran lebih kecil dari fibroblas (aktif), biasanya berbentuk spindle dengan penonjolan yang lebih sedikit, nukleus yang lebih kecil, panjang, dan gelap, serta sitoplasma yang asidofilik dengan sedikit retikulum endoplasma (RE) kasar. Sitoplasmanya bercabang, mengelilingi nukleus yang elips dan berbintik dengan satu atau dua nukleolus. Sementara fibroblas (aktif) dapat dikenali dengan nukleus yang oval dan pucat, sitoplasma yang lebih banyak, RE kasar, aparatus golgi, vesikel sekretori, dan mitokondria (Sandhu *et.al.*, 2012, dan Dave *et.al.*, 2014).

2.4.1.2.1.2 Peran

Pada jaringan sehat, fibrosit berada pada keadaan inaktif, namun dapat secara aktif mengalami proliferasi menjadi fibroblas ketika mendapat stimuli mitogenik (pemicu mitosis), seperti *signalling* dari *growth factor* ketika terjadi luka pada jaringan. Setelah merespon *growth factor* dan memasuki daerah luka, fibroblas mengalami proliferasi dan konversi (Enoch *et.al.*, 2008, dan Czubryt, 2012).



Gambar 2.7 Fibroblas manusia dewasa, dengan phase contrast, pembesaran 200x (Science Cell Laboratories).

2.4.1.2.2 Proto-myofibroblas

Saat ini mulai dikenal bahwa perubahan sel fibroblas menjadi myofibroblas dimulai dengan munculnya proto-myofibroblas, yang di dalamnya hanya terdapat β - dan γ -cytoplasmic actins. Proto-myofibroblas biasanya berkembang menjadi myofibroblas terdiferensiasi yang mampu melakukan kontraksi hanya setelah terdapat ekspresi *stress fiber α -smooth muscle actin* (α -SMA). Salah satu pertanda penting agar terjadi pembentukan sifat kontraktile dari proto-myofibroblas adalah adanya ketegangan secara mekanis (*mechanical tension*) atau kontraktilitas, sehingga fibroblas yang terkena stress mekanis dari jaringan granulasi di

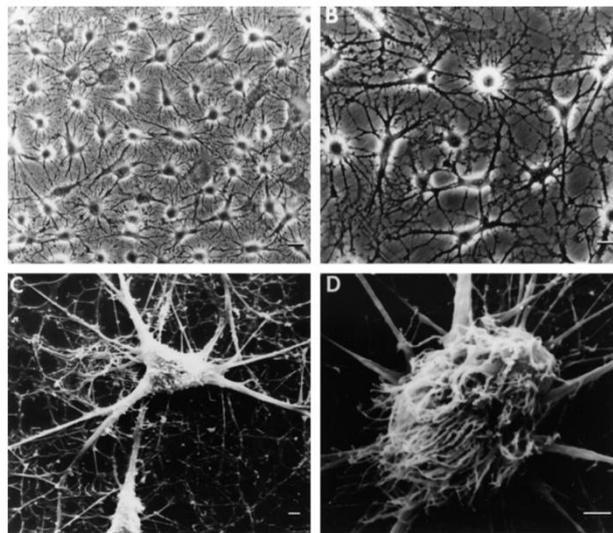
sekitarnya akan membentuk stress fiber dan mengalami diferensiasi menjadi myofibroblas. Diferensiasi ini dipengaruhi oleh *growth factor* TGF- β (Tomasek *et.al.*, 2002, Meyer-ter-Vehn *et.al.*, 2006, dan Darby *et.al.*, 2014).

2.4.1.2.3 Myofibroblas

2.4.1.2.3.1 Karakteristik

Myofibroblas memiliki karakteristik sebagai berikut:

- Morfologi *spindle-cell* atau *stellate-cell*
- Sitoplasma eosinofilik pucat
- *Pericellular matrix* dalam jumlah banyak
- Immunofenotip: terdapat vimentin, α -SMA, non-muscle myosin, fibronectin; tidak terdapat smooth-muscle myosin dan desmin.

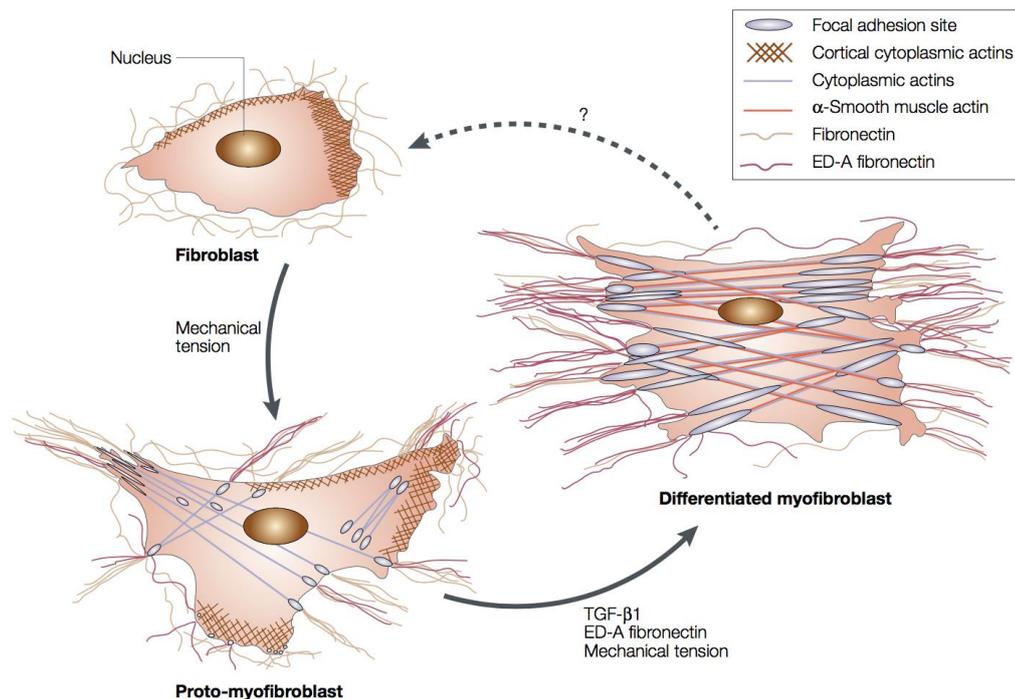


Gambar 2.8 *Phase-contrast micrographs* (A dan B) dan *scanning electron micrographs* (C dan D) dari sel stellata myofibroblas, menunjukkan gambaran badan sel yang sangat refraktil dan prosesus sel yang sangat bercabang (Powell, 1999).

- Ultrastruktur: retikulum endoplasma kasar yang dominan, myofilamen perifer, aparatus golgi yang memproduksi granula sekretorik kolagen, *fibronexus junctions* tanpa lamina, *gap junctions* (Eyden, 2008).

2.4.1.2.3.2 Peran

Secara umum telah disepakati bahwa sumber utama myofibroblas berasal dari fibroblas jaringan ikat sekitar yang direkrut menuju daerah luka. Myofibroblas merupakan tipe sel efektor utama dalam penyakit fibrosis yang memproduksi ECM, *crosslinking enzymes*, dan inhibitor MMP dalam jumlah besar. Myofibroblas juga memiliki sifat kontraktile yang dimediasi oleh protein filamen perantara, seperti vimentin (VIM) dan α -SMA (Brisset *et.al.*, 2001, Falke *et.al.*, 2005, dan Czubryt, 2012).

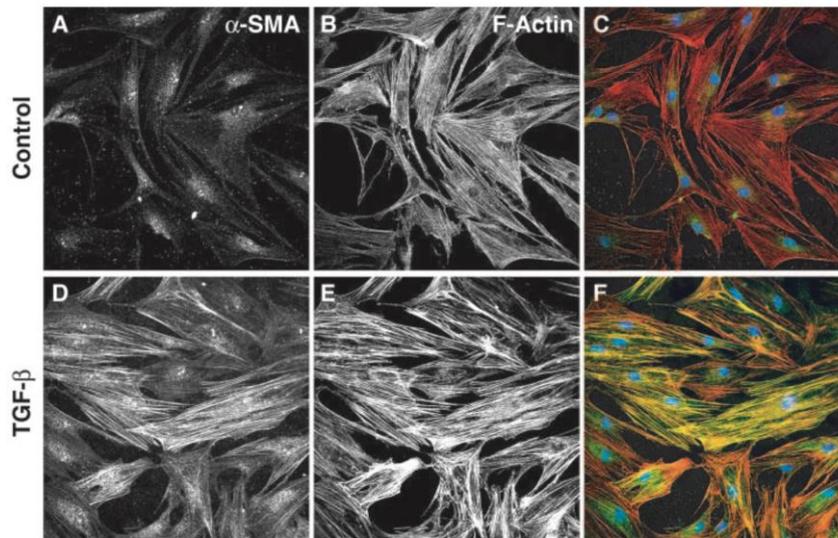


Gambar 2.9 Fase diferensiasi sel fibroblas menuju myofibroblas terdiferensiasi (Tomasek *et.al.*, 2002).

Sementara itu, sebagaimana sinyal mekanis sangat berperan dalam diferensiasi fibroblas dan proto-myofibroblas, maka diferensiasi menjadi myofibroblas pun melibatkan perubahan komposisi dan kekakuan ECM pada jaringan yang terluka ketika proses perbaikan jaringan berlangsung. Semakin kaku kolagen ECM di sekitar fibroblas, maka semakin tinggi jumlah *stress fiber* yang dihasilkan, sehingga adesi focal yang kuat semakin terbentuk. Hal ini menjadi *positive feedback loop*, yaitu ketika peningkatan sinyal stress mekanis dapat meningkatkan diferensiasi dan *survival* myofibroblas, yang juga tegak lurus dengan produksi TGF- β . Sebaliknya, berkurangnya stress mekanis atau kekakuan jaringan terbukti dapat menginduksi apoptosis serta penurunan ekspresi α -SMA dan kontraktilitas pada myofibroblas. Apoptosis myofibroblas juga diperkirakan merupakan akibat dari berkurangnya konsentrasi *growth factor* lokal yang awalnya berperan untuk *survival* myofibroblas (Meyer-ter-Vehn *et.al.*, 2006, dan Darby *et.al.*, 2014).

2.4.1.3 α -SMA

Myofibroblas mengekspresikan protein *stress fiber* α -SMA (*α -smooth muscle actin*, atau *alpha actin-2* [ACTA2]) dalam kadar yang tinggi. *Stress fiber* ini menyebabkan peningkatan kontraktilitas, sehingga α -SMA secara general dianggap sebagai penanda atau *marker* definitif yang mampu mengidentifikasi seluruh myofibroblas pada jaringan yang diteliti. Sementara itu, hingga saat ini masih belum diketahui kemampuan myofibroblas untuk kembali pada fenotip inaktifnya, yaitu fibroblas tanpa ekspresi α -SMA (Darby *et.al.*, 2014 dan Falke *et.al.*, 2015).



Gambar 2.10 Ekspresi α -SMA dan rekrutmen actin stress fibers pada sebagian sel yang diinduksi TGF- β (Meyer-ter-Vehn et.al., 2006).

2.4.2 Patologis

2.4.2.1 Skar/fibrosis

Skar merupakan gangguan makroskopis pada struktur dan fungsi arsitektur jaringan yang berasal dari hasil akhir luka yang telah sembuh. Proses fibrosis dari pembentukan skar melibatkan *complex interplay* antara beberapa gen pleiotropik, termasuk *transforming growth factor β* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor*, dan *connective tissue growth factor* (Enoch et.al., 2008 dan Falke et.al., 2015).

Pada banyak kondisi fibrosis dan jaringan skar, seperti juga pada respon stroma terhadap tumor, diperkirakan myofibroblas gagal mengalami apoptosis sehingga menetap dan menyebabkan kondisi patologis dan *scarring*. Pada penyembuhan luka normal, ECM akan menghilang perlahan-lahan bersamaan dengan kembalinya struktur dan fungsi normal jaringan. Namun pada fibrosis, *scarring* ini berlanjut, terlipat ganda, dan diperparah dengan beberapa lingkaran

timbang-balik positif, termasuk di dalamnya respon mekanis yang juga penting dalam menyebabkan kontraktur setelah luka. Kontraktur pada jaringan ikat melibatkan pemendekan bahan-bahan pada ECM secara gradual dan anatomis, berbeda dari kontraksi otot biasa (Tomasek *et.al.*, 2002, Garber, 2013, dan Darby *et.al.*, 2014).

2.5 Subkultur (*Passage*)

Subkultur, atau disebut juga *passage*, adalah penghilangan media dan pemindahan sel dari kultur sebelumnya ke media pertumbuhan yang baru, yaitu sebuah prosedur yang memfasilitasi pembiakan sel lebih lanjut. Biakan atau kultur sel ini dapat berupa kultur *adherent* (disebut juga *monolayer*), yaitu ketika biakan menempel pada dasar media, atau berupa suspensi. Biakan fibroblas sendiri merupakan biakan *adherent*. Ketika 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 (Phan, 2008, dan Thermofisher, 2017).

Sel pada kultur biasanya berproliferasi mengikuti pola pertumbuhan yang standar. Fase pertama adalah fase *lag*, yaitu fase pertumbuhan lambat ketika sel mengalami adaptasi terhadap lingkungan sekitar, hingga kemudian berlanjut pada fase *log*, yaitu ketika sel berproliferasi semakin cepat dan mengonsumsi nutrisi pada medium. Ketika sel sudah tumbuh memenuhi seluruh medium, sel memasuki fase *plateau*, yaitu ketika proliferasi amat berkurang atau berhenti sama sekali. Kegagalan melakukan subkultur pada sel yang konfluen akan menyebabkan

penurunan indeks mitosis, hingga pada akhirnya menyebabkan kematian sel pada kultur (Ricardo *et.al.*, 2008 dan Thermofisher, 2017).

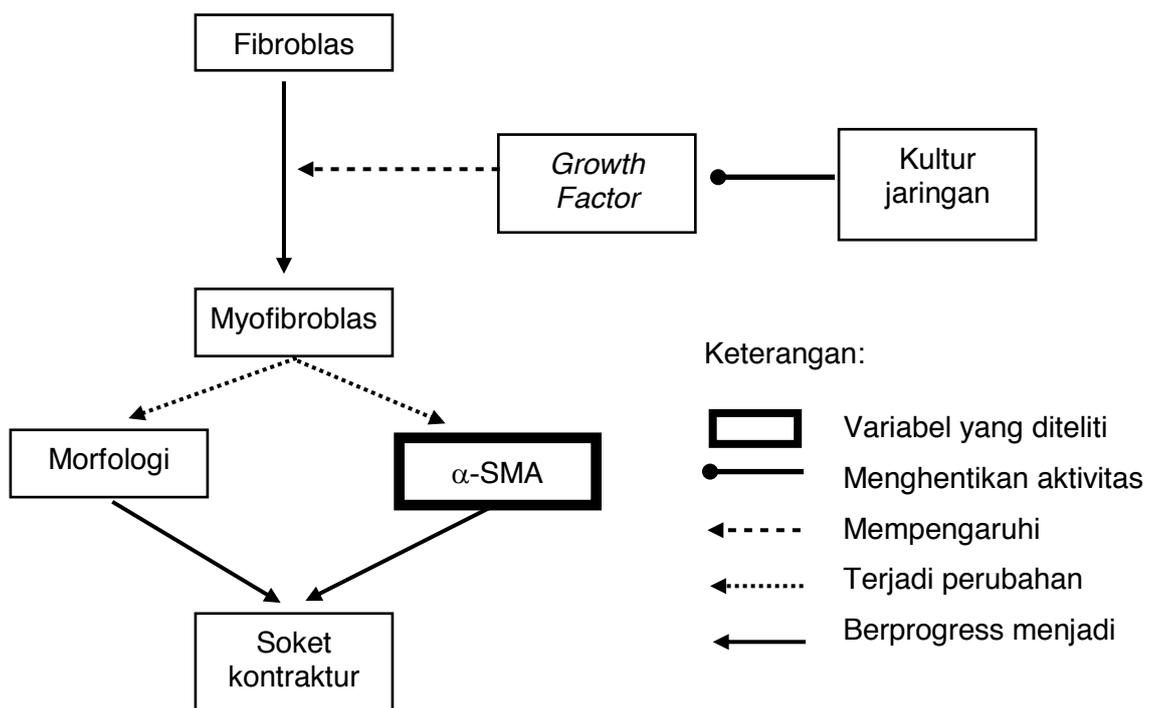
Langkah pertama dalam melakukan subkultur adalah memisahkan sel dari permukaan kultur primer dengan tripsinisasi atau secara mekanis. Hasil pemisahan ini kemudian dilakukan subdivisi atau penanaman kembali pada media kultur yang baru. Pada subkultur kedua ini dilakukan pemeriksaan pertumbuhan serta diberikan nutrisi secara periodik, dan kemudian dapat disubkultur kembali untuk mendapatkan subkultur ketiga. Waktu antar-subkultur yang diperlukan akan berbeda sesuai dengan tipe dan tingkat pertumbuhan sel yang diteliti. Khusus pada sel dengan kultur *adherent*, subkultur harus dilakukan pada saat sel sedang dalam fase *log* sebelum konfluensi tercapai, karena jika sudah terjadi konfluensi, sel sulit untuk memperbaiki diri (Ricardo *et.al.*, 2008 dan Thermofisher, 2017).

Pada kenyataannya, jumlah subkultur sel juga perlu diperhatikan. Meskipun belum ada standar baku yang menentukan jumlah minimal atau maksimal sebuah sel bisa dilakukan subkultur, perlu diingat bahwa banyaknya jumlah subkultur dapat mengubah genotipe—bahkan fenotipe—dari sel tersebut akibat semakin jauhnya biakan sel tersebut dari kultur sel awalnya. Selain itu, subkultur yang terlalu banyak juga dapat meningkatkan resiko kontaminasi mikroba (Masters *et.al.*, 2007).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Terjadinya soket kontraktur orbita salah satunya disebabkan oleh terbentuknya jaringan fibrosis atau skar. Dalam tubuh manusia, proses penyembuhan jaringan yang mengandung sel fibroblas di dalamnya dipengaruhi oleh *growth factor* ketika terjadi jejas atau luka. *Growth factor* memediasi perubahan morfologi sel fibroblas menjadi myofibroblas, dengan jumlah sel myofibroblas ditunjukkan oleh tingkat ekspresi marker α -SMA. Oleh karena itu, peneliti ingin mengamati tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan yang sudah dikeluarkan dari tubuh dan dikultur serta subkultur. Dengan membiakkan jaringan di luar tubuh manusia, maka diharapkan tidak ada *growth factor* yang memediasi

perubahan sel fibroblas menjadi myofibroblas, sehingga sel akan kembali menjadi fibroblas dan tingkat ekspresi α -SMA akan turun. Untuk memastikan peran *growth factor* dalam penelitian ini, maka diperlukan kelompok yang diberikan *growth factor* TGF- β sebagai kelompok kontrol, yaitu kelompok yang akan menunjukkan tingkat ekspresi yang sama pada tiap-tiap subkulturnya.

3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat penurunan tingkat ekspresi α -SMA setelah subkultur jaringan soket kontraktur orbita (tanpa pengaruh *Growth Factor* jaringan).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan model *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan penurunan tingkat ekspresi α -SMA pada kultur sel myofibroblas jaringan soket kontraktur.

4.2 Sampel Penelitian

Perhitungan besaran sampel penelitian berdasarkan rancangan penelitian eksperimental, dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

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

dengan t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah replikasi. Pada penelitian ini didapatkan 3 kelompok penelitian, maka jumlah replikasi yang diperlukan pada tiap kelompok adalah 9 kali. Dengan demikian banyaknya sampel yang diperlukan pada penelitian ini adalah sebanyak 27 sumuran untuk keseluruhan sampel penelitian. Untuk jumlah lapang pandang yang diamati, minimal dilakukan 3 kali foto.

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam waktu 3 bulan. Subyek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3 sampai 5, dikarenakan pasien dengan derajat tersebut adalah pasien yang diindikasikan untuk dilakukan tindakan rekonstruksi soket. Kultur

jaringan dan pemeriksaan parameter dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1 Kriteria Inklusi

Subyek yang dipilih dalam penelitian ini adalah 1 pasien di RS dr. Saiful Anwar Malang dengan soket kontraktur derajat 3 sampai 5 dengan indikasi operasi rekonstruksi soket.

4.4.2 Kriteria Eksklusi

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

4.5 Variabel Penelitian

- Variabel bebas: subkultur
- Variabel tergantung: tingkat ekspresi α -SMA

4.6 Definisi Operasional

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 fibroblas manusia adalah biakan sel – sel fibroblas yang didapatkan dari jaringan tenon manusia yang diperoleh dari operasi rekonstruksi soket kontraktur di kamar operasi RSSA dan ditanam pada media kultur.

3. Subkultur jaringan kontraktur manusia adalah biakan dari sel fibroblas/myofibroblas jaringan soket kontraktur yang diambil dari pasien soket kontraktur derajat 3 sampai dengan 5.
4. *Growth Factor* yang diperiksa adalah TGF- β (*transforming growth factor- β*), yaitu *growth factor* yang berperan penting dalam regulasi respon imun, proliferasi, diferensiasi dan migrasi sel, proses penyembuhan luka, hemostasis vascular, serta fibrosis. TGF- β yang digunakan merupakan TGF- β 1 manusia rekombinan produk dari Abcam dengan nomor register ab50036. Pada kelompok kontrol, dosis TGF- β yang diberikan adalah 10ng/mL.
5. α -SMA (*alpha smooth muscle actin*) adalah protein yang meningkatkan kontraktilitas sel dan membentuk fenotip myofibroblas. Tingkat ekspresi α -SMA diukur dengan antibodi anti α -SMA [1A4] dengan nomor register ab7817 dari merk dagang Abcam. Pengukuran dilakukan dengan metode immunofluorescence.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat:

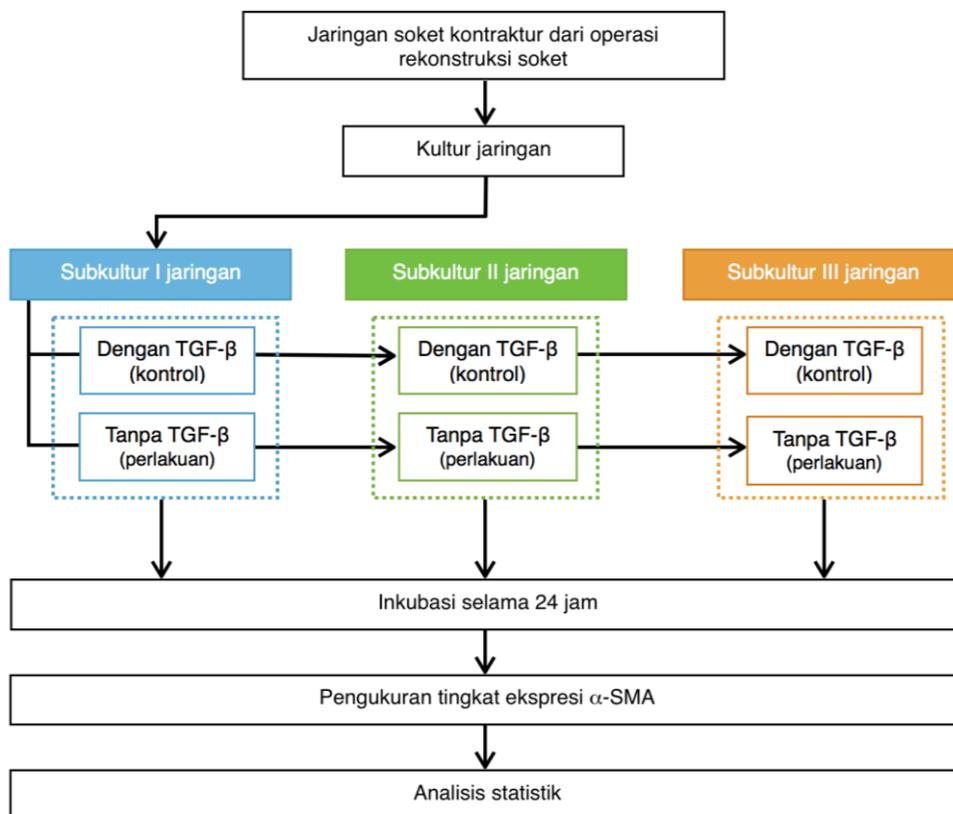
- *Hood* kultur sel (*laminar-flow hood* atau *biosafety cabinet*)
- Inkubator (disarankan inkubator lembab CO₂)
- *Water bath*
- Setrifus
- Pendingin dan *freezer* (-20°C)
- *Cell counter*
- Mikroskop *inverted*
- Kontainer *cryostorage* atau *freezer* Nitrogen (N₂) cair

- Sterilisator (seperti autoklaf)

4.7.2 Bahan Penelitian:

- Kultur sel fibroblas (myofibroblas) jaringan soket kontraktur, yaitu jaringan tenon diambil dari soket kontraktur pasien yang dilakukan operasi rekonstruksi soket
- Collagenase II (invitrogen, Carlsbad, CA)
- Falcon T-25 flasks (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Bedford, MA)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Serum fetal sapi (*Fetal Bovine Serum* atau FBS)
- Antibiotik-antimikroba (Gibco-Carlsbad, CA)
- Trypsin 0,05%
- Phosphate-buffered saline

4.8 Alur Penelitian



4.9. Perlakuan:

- Kultur dan subkultur jaringan di media biakan berlaku sebagai perlakuan
- Pemberian TGF- β bertujuan sebagai kontrol, bukan sebagai perlakuan

4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Pengambilan Sampel

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 ini kemudian disimpan dan dilakukan kultur dan subkultur. Tindakan ini memenuhi standar deklarasi Helsinki dan disetujui oleh komisi etik RS dr. Saiful Anwar Malang. Pengambilan sampel dan kultur adalah sebagai berikut:

- Jaringan tenon dipotong – potong sebesar 1 mm³ menggunakan pisau bedah ukuran 11. Collagenase II (invitrogen, Carlsbad, CA) sebanyak 750 U/ml ditambahkan pada potongan fragmen tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam.
- Ambil campuran tersebut dengan menggunakan jarum 18G, 21G, dan 23G, sebanyak 4 kali dari tiap – tiap jarum, kemudian sampel di sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit.
- Sel diletakkan pada media Falcon T-25 flasks (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) dengan 5 ml DMEM media kultur. Media kultur mengandung 10% FBS dan Antibiotik-antimikroba (Gibco-Carlsbad, CA)
- Sel kultur disimpan pada suhu 37°C pada inkubator yang dijaga kelembapannya dengan 5% CO₂.
- Media diganti setiap 3 hari sampai dengan fibroblas tumbuh dengan baik. Jika fibroblas telah tumbuh dengan baik, kemudian dilakukan sub kultur

dengan 75 cm² Falcon T-75 flasks (Becton-Dickinson, Bedford, MA) menggunakan trypsin 0,05% (Gibco) dalam larutan garam sulfat.

- Sub kultur ditempatkan pada media DMEM bebas serum tanpa kandungan *phenol red-containing 0,1% bovine albumin serum* (Sigma, St. Louis, MO) dan antibiotik.
- Sub kultur dilakukan tiga kali.

4.10.2 Kultur dan Subkultur

1. Resuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*.
2. Ambil 300 µl panen sel dan masukkan ke dalam *conical* yang lain. Tambahkan 5-7 ml MK dan resuspensi kembali.
3. Tuang sel ke dalam *dish* baru yang telah disiapkan. Penanaman secara homogen dan amati kondisi sel.
4. Inkubasi semalam dan ganti MK jika medium sudah berwarna merah pucat.
5. Ambil sel dari inkubator CO₂, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen.
6. Buang media dengan menggunakan mikropipet atau pipet pasteur steril.
7. Cuci sel diulang 2 kali dengan PBS (volume PBS adalah ± 1/2 volume media awal).
8. Tambahkan tripsin-EDTA (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
9. Tambahkan media ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin.
10. Amati keadaan sel di mikroskop. Resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
11. Transfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam conical steril baru.
12. Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi..

4.10.3 Pemeriksaan Tingkat Ekspresi α -SMA Menggunakan Immuno-fluorescence

Immunofluorescence adalah bagian dari metode yang telah dikembangkan untuk memperlihatkan ekspresi protein spesifik pada sel dengan prinsip ikatan antigen-antibodi dan menggunakan pendaran *fluorochrome*. *Fluorochrome* adalah senyawa *fluorescence* mengikat antibodi primer secara langsung.

4.10.4.1 Alat:

- Mikropipet 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l
- Pinset
- Cover slip
- *Slide glass*
- *Enam well plate*

4.10.4.2 Bahan:

- Alkohol 70% dingin
- PBS 1x
- 1% BSA dalam PBS
- DAPI
- 1st Antibody
- 2nd Antibody (FITC dan Alexa 488 anti-mouse/anti-rabbit)

4.10.4.3 Prosedur

1. Setelah sel normal kembali, segera buat satu konsentrasi sampel yang diinginkan, misalnya 1/2 IC₅₀ untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l/well.
2. Ambil *well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO₂.

3. Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
4. Cuci sel 1 x dengan 500 μ L PBS 1x
5. Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
6. Masukkan sampel sebanyak 1000 μ L ke dalam sumuran
7. Masukkan 1000 μ L MK untuk kontrol sel (2 kontrol sel).
8. Inkubasi di dalam inkubator CO₂
9. Amati kondisi sel setelah waktu inkubasi
10. Fiksasi sel menggunakan 500 μ l etanol 70% dingin selama 15 menit pada suhu ruang.
11. Buang etanol 70 % dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.
12. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit
13. Inkubasi sel dengan 50 μ L blocking serum (1% BSA in PBS), inkubasi 30 menit
14. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit
15. Inkubasi sel dengan 50 μ L Ab primer, inkubasi semalam di 4^oC
16. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit
17. Inkubasi sel dengan 50 μ L Ab sekunder (FITC/Alexa), inkubasi 1 h di suhu ruang dalam wadah gelap
18. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit, lakukan dalam wadah gelap
19. Tambahkan 50 μ l DAPI 1 μ g/ml, inkubasi 10 menit di suhu ruang dalam wadah gelap
20. Cuci dengan 500 μ L PBS 1x sebanyak 3 x masing- masing 5 menit, lakukan dalam wadah gelap.

21. Ambil dan letakkan *cover slip* di atas *object glass*, tetesi dengan lem (*mounting media: entelen*). Tutup *cover slip* dengan *cover glass*.
22. Amati dengan mikroskop imunofluorosens.
FITC: Ex 494 nm, em 518 nm
DAPI: Ex 341 nm, em 452 nm
23. Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi.

4.11 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis sebagai data kelompok dengan menghitung rata-rata (*mean*) dan standard deviasi tiap kelompok dan diuji menggunakan uji statistik yang sesuai. Sebelum pengujian, normalitas dan homogenitas data diuji terlebih dahulu. Data yang dipergunakan untuk mengambil kesimpulan adalah data kelompok dengan nilai uji normalitas *saphiro-wilk* bernilai $>0,05$ dan homogen dengan nilai uji *homogeneity of variance* $>0,05$. Selanjutnya jika data subkultur I, II, III, dan kelompok kontrol merupakan data yang normal dan homogen, dilakukan uji *One way Anova* dan LSD dengan kebermaknaan < 0.05 . Jika data tidak normal, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*. Untuk menguji hubungan antara masing-masing kelompok subkultur I, II, III dengan kelompok yang diberi perlakuan TGF- β , dilakukan uji *Independent T-Test*.

4.12 Etika Penelitian

Ethical clearance penelitian ini diajukan pada Komite Etik RS dr. Saiful Anwar Malang.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

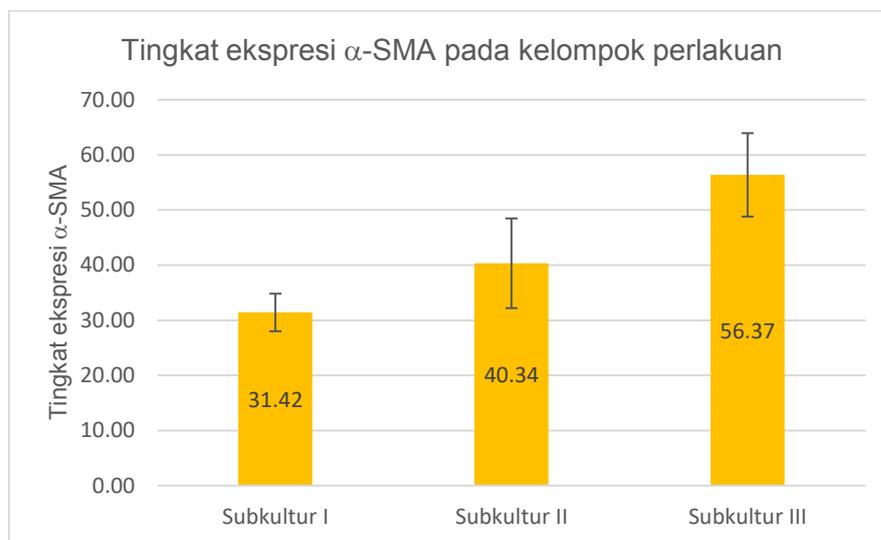
Pada penelitian ini dilakukan kultur dan subkultur jaringan dari pasien dengan soket kontraktur orbita derajat 4. Pada pemeriksaan dilakukan 5 kali foto lapang pandang untuk setiap sumuran. Variabel yang diukur adalah tingkat ekspresi α -SMA, baik pada kelompok yang diberi perlakuan subkultur I, II, III, atau pada kelompok kontrol yang diberikan *growth factor* TGF- β pada media subkulturnya. Melalui pengamatan dan interpretasi kadar dari Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Olympus type FV1000, hasil pemeriksaan tingkat ekspresi α -SMA dari kelompok subkultur I, II, dan III dapat dilihat dari tabel 5.1.

Tabel 5.1 Tingkat ekspresi α -SMA pada kelompok perlakuan

Lapang Pandang	SP 1	SP2	SP3
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

Sumber: Hasil penelitian, 2017

Pada gambar 5.1 juga dapat dilihat bahwa rerata tingkat ekspresi α -SMA mengalami peningkatan, yaitu pada subkultur I menunjukkan angka 31,42, sedangkan pada subkultur II tingkat ekspresi α -SMA menunjukkan angka 40,34, dan subkultur III menunjukkan angka 56,37.



Gambar 5.1 Grafik rerata tingkat ekspresi α -SMA pada ketiga kelompok perlakuan, yaitu subkultur I, II, dan III.

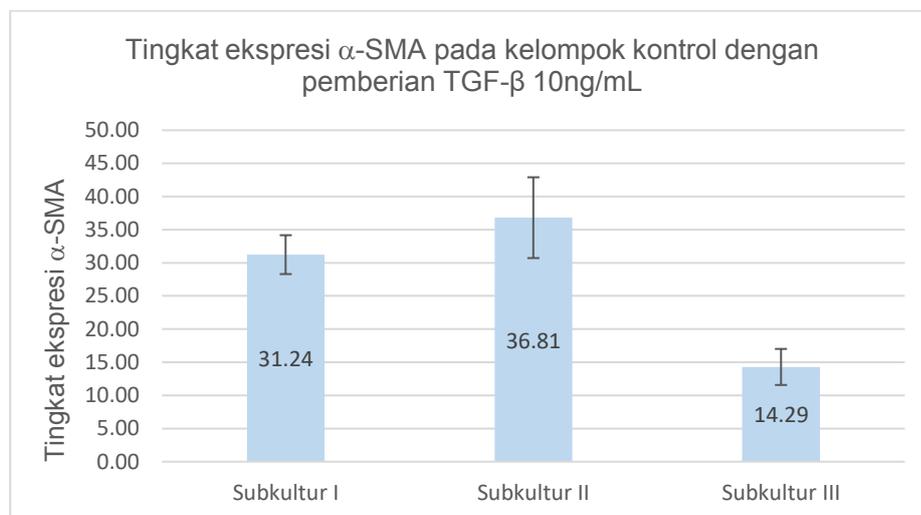
Sementara hasil pemeriksaan tingkat ekspresi α -SMA dari kelompok subkultur I, II, dan III yang telah diberikan *growth factor* TGF- β 10ng/mL pada media subkultur dapat dilihat dari tabel 5.2.

Tabel 5.2 Tingkat ekspresi α -SMA pada kelompok kontrol (dengan TGF- β 10ng/mL)

Lapang Pandang	SP 1	SP2	SP3
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

Sumber: Hasil penelitian, 2017

Pada gambar 5.2 didapatkan bahwa rerata tingkat ekspresi α -SMA pada kelompok kontrol yang diberikan *growth factor* TGF- β 10ng/mL menunjukkan angka 31,24 pada subkultur I, 36,81 pada subkultur II, dan mengalami penurunan pada subkultur III, yaitu 14,29.



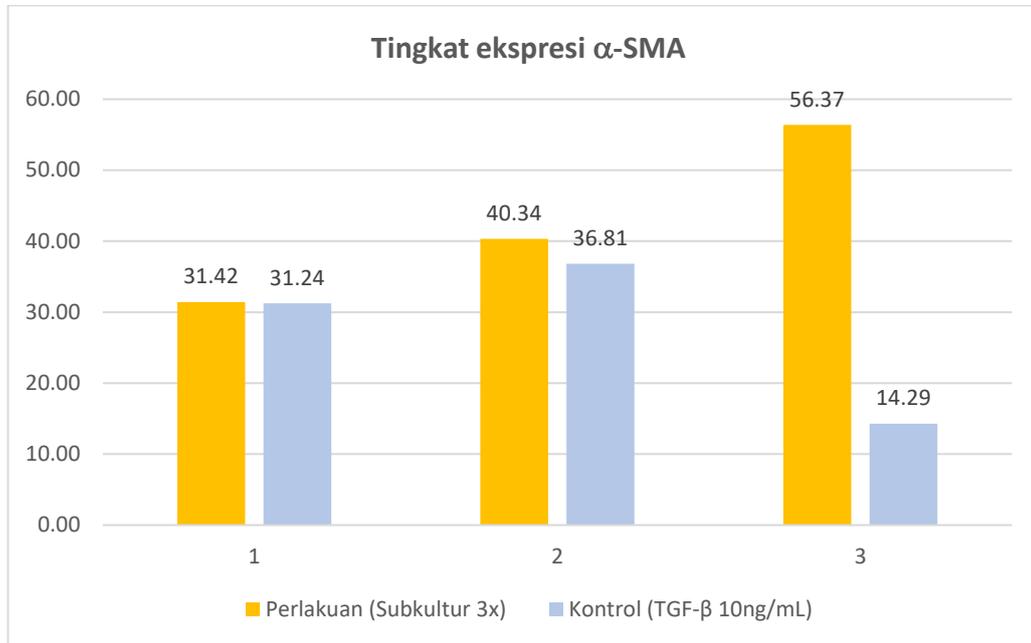
Gambar 5.2 Grafik rerata tingkat ekspresi α -SMA pada ketiga kelompok kontrol, yaitu subkultur I, II, dan III dengan penambahan TGF- β .

Jika disandingkan antara kelompok perilaku dan kelompok kontrol dalam satu grafik, maka didapatkan sedikit perbedaan tingkat ekspresi α -SMA pada kelompok subkultur I dan II, namun terdapat perbedaan yang cukup besar pada kelompok subkultur III (Gambar 5.3). Untuk hasil pengamatan melalui mikroskop dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, dapat dilihat pada Gambar 5.4.

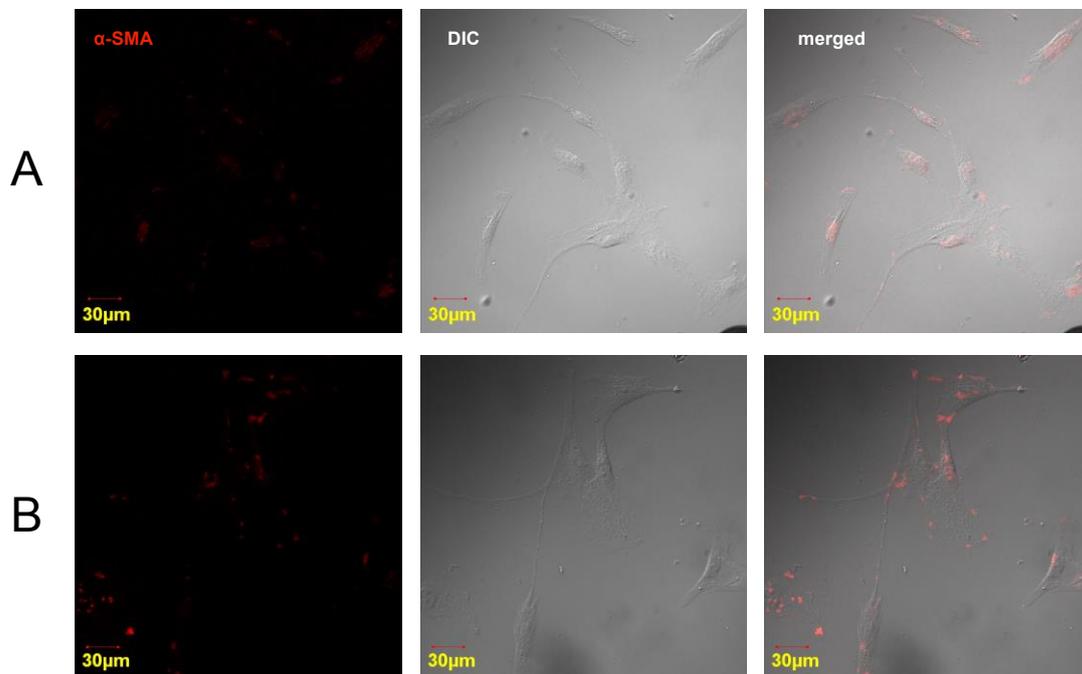
5.2 Analisis Data

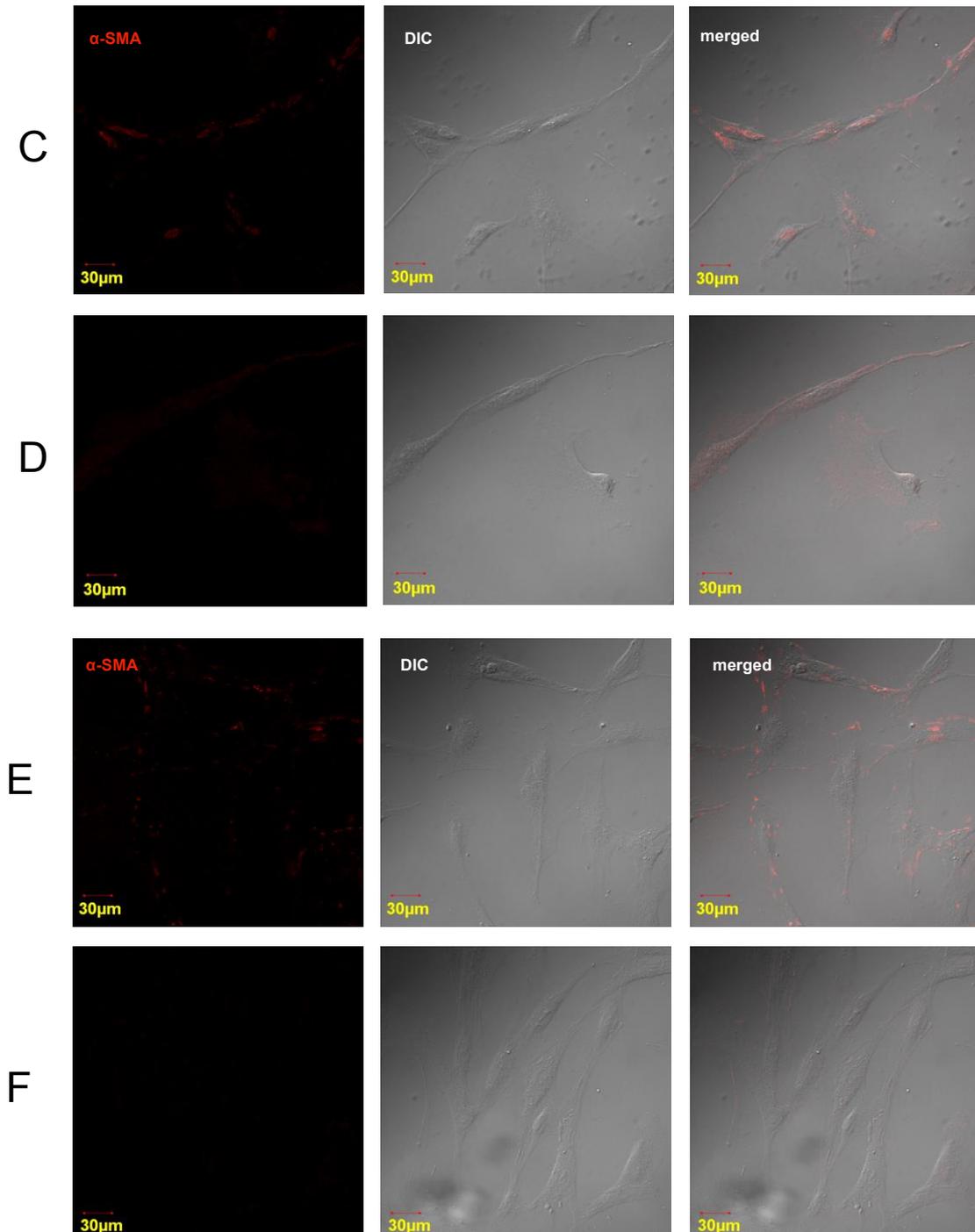
Hasil penelitian dianalisis menggunakan aplikasi analisis statistik IBM SPSS *version* 2.0. Analisis data hasil perhitungan tingkat ekspresi α -SMA pada kelompok perlakuan menggunakan uji statistik non-parametrik, karena data pada kelompok perlakuan tidak memenuhi syarat uji normalitas (dengan $p < 0,05$).

Data sampel diuji dengan uji normalitas menggunakan pengujian *Shapiro-Wilk* karena data yang didapat kurang dari 50. Karena distribusi data tidak normal, maka dilakukan uji analisa statistik non-parametrik dengan uji *Kruskal-Wallis*, dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui hubungan antar masing-masing kelompok.



Gambar 5.3 Grafik sejajar rerata tingkat ekspresi α -SMA pada keenam kelompok perlakuan dan kontrol.





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. Subkultur I (A), Subkultur I dengan TGF- β 10ng/mL (B), Subkultur II (C), Subkultur II dengan TGF- β 10ng/mL (D), Subkultur III (E), Subkultur III dengan TGF- β 10ng/mL (F).

Setelah dilakukan analisa statistik menggunakan *Kruskal-Wallis*, level signifikansi yang didapat dari kelompok perlakuan adalah $p=0,005$ ($p<0,05$), sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara jumlah subkultur dengan tingkat ekspresi α -SMA. Sementara hasil analisis uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5.3 Hasil Uji *Mann-Whitney*

Kelompok subkultur	2	3
1	0,117	0,009*
2		0,009*

*berbeda secara signifikan ($p<0,05$)

Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa dari uji *Mann-Whitney*, perbandingan dengan kelompok subkultur 3 menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Selanjutnya dilakukan analisa hasil tingkat ekspresi α -SMA pada kelompok kontrol. Pada uji normalitas, kelompok kontrol memiliki $p>0,05$, yang menandakan bahwa distribusi data kelompok kontrol adalah normal. Selanjutnya dilakukan uji *Homogeneity of variance* untuk mengetahui homogenitas dari data kelompok kontrol, yang kemudian menunjukkan $p>0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data dari kelompok kontrol adalah homogen. Karena normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji analisis statistik parametrik dengan uji *ANOVA*.

Pada uji *ANOVA* didapatkan nilai signifikansi sebesar $p=0.000$ ($p<0.05$), sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara jumlah subkultur yang diberikan TGF- β 10ng/mL dengan tingkat ekspresi α -SMA.

Selanjutnya dilakukan uji *Post-hoc Tukey HSD* untuk mengetahui hubungan antar kelompok kontrol dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji *Post-hoc Tukey HSD*

Kelompok subkultur	2	3
1	0,133	0,000*
2		0,000*

*berbeda secara signifikan ($p < 0,05$)

Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa dari uji *Post-hoc Tukey HSD* yang dilakukan, hubungan dengan kelompok subkultur 3 menunjukkan perbedaan yang signifikan. Selanjutnya untuk membandingkan hasil tingkat ekspresi α -SMA antara perlakuan dengan kontrol pada subkultur yang sama, digunakan uji *Independent T-test*.

Tabel 5.5 Hasil Uji *Independent T-test*

Perlakuan/Kontrol	1	2	3
1		0,133	0,000*
2			0,000*
3			

*berbeda secara signifikan ($p < 0,05$)

Sementara, dari hasil uji *Independent T-test*, dapat dilihat bahwa hubungan antara masing-masing kelompok subkultur menunjukkan kenaikan tingkat signifikansi, dengan perbedaan yang paling bermakna dapat dilihat di antara kelompok subkultur I antara perlakuan-kontrol dan subkultur II antara perlakuan-kontrol.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Hubungan Jumlah Subkultur dengan Tingkat Ekspresi α -SMA

Pada perjalanan penyakit soket kontraktur orbita, proses fibrosis merupakan kunci utama terjadinya *scarring*, di mana *scarring* ini salah satunya merupakan hasil dari kegagalan apoptosis sel myofibroblas (Poonyathalang *et.al.*, 2005 dan Darby *et.al.*, 2014). Munculnya ekspresi α -SMA pada jaringan merupakan cerminan atau marker dari adanya sel myofibroblas (Falke *et.al.*, 2015). Pada penelitian ini, subkultur dilakukan sebanyak tiga kali, dengan alasan bahwa penelitian-penelitian yang dilakukan sebelumnya terbatas pada subkultur 4-8, sehingga belum ada penelitian yang melakukan tiga kali subkultur dari kultur primer (Hinz *et.al.*, 2001, Kinner *et.al.*, 2001, Kinnman *et.al.*, 2003, dan Walker *et.al.*, 2004).

Dari data hasil penelitian yang didapat, jumlah satu kali subkultur ternyata masih belum memberikan perubahan tingkat ekspresi α -SMA yang signifikan, meskipun terdapat sedikit kenaikan (Tabel 5.3). Namun ketika sampai pada subkultur ketiga, tingkat ekspresi α -SMA mengalami kenaikan yang bermakna dari subkultur pertama ($p < 0.05$). Hal ini juga dibuktikan oleh penelitian Kinner *et.al.* pada tahun 2001 yang mengamati kadar α -SMA menggunakan *Western blot analysis*, dengan hasil yaitu kadar α -SMA yang mengalami peningkatan mengikuti jumlah subkultur atau *passage* yang dilakukan. Penelitian ini menunjukkan bahwa sifat dan karakter myofibroblas pada jaringan soket kontraktur mirip dengan myofibroblas dari kondrosit sendi manusia seperti pada penelitian Kinner *et.al.*

tahun 2001, yaitu peningkatan jumlah sel seiring dengan peningkatan jumlah subkultur.

Perlu diingat bahwa salah satu faktor utama perubahan fisiologis dari fibroblas menjadi myofibroblas yaitu dibutuhkan adanya *mechanical tension*. Ternyata, penelitian terbaru menunjukkan adanya peningkatan kekakuan matriks yang progresif seiring berjalannya waktu jika jaringan sejak mula sudah mengalami *tension* (Wakatsuki *et.al.*, 2000). Mengingat bahwa proses subkultur pada penelitian ini memerlukan waktu tiga minggu untuk menunggu sel fibroblas mengalami adhesi pada dasar sumuran, maka peningkatan kekakuan jaringan ini dapat menjadi penyebab peningkatan jumlah sel myofibroblas seiring meningkatnya jumlah subkultur, yang ditandai dengan peningkatan tingkat ekspresi α -SMA.

6.2 Hubungan Jumlah Subkultur dengan Perubahan Myofibroblas menjadi Bentuk Inaktifnya (Fibroblas)

Di akhir proses *wound healing* fisiologis, myofibroblas mengalami apoptosis agar tidak lagi memproduksi ECM (Tomasek *et.al.*, 2002 dan Darby *et.al.*, 2014). Namun pada penelitian-penelitian sebelumnya, masih belum terdapat data mengenai perubahan langsung dari myofibroblas aktif (terdiferensiasi) menjadi tahap inaktifnya (yaitu fibroblas biasa) (Gambar 2.9). Penelitian ini menunjukkan bahwa setelah dilakukan subkultur atau *passage*, myofibroblas terdiferensiasi ternyata tidak mengalami perubahan menjadi bentuk inaktifnya, yang ditandai dengan tidak terjadinya penurunan tingkat ekspresi α -SMA.

Pada tahun 2005, Manapov *et.al.* melakukan penelitian pada myofibroblas dari pankreas. Dari penelitian ini ditemukan bahwa myofibroblas dari jaringan pankreas yang mengalami *wound healing* tersebut memiliki sifat sementara.

Perubahan fenotip ini ternyata berhubungan dengan translokasi p21^{Cip1/WAF1} dari nukleus ke dalam sitoplasma.

6.3 Hubungan Pemberian TGF- β dengan Tingkat Ekspresi α -SMA

Sebelum dilakukan penelitian, peneliti membuat hipotesis bahwa pemberian TGF- β dengan kadar 10ng/mL pada tiap subkultur akan menjadi kontrol dengan tingkat ekspresi α -SMA yang sama pada tiap kelompoknya. Dosis TGF- β yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10ng/mL, dengan dasar teori bahwa penelitian-penelitian sebelumnya dengan menggunakan dosis TGF- β 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).

Penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian TGF- β dosis yang sama pada tingkatan subkultur yang berbeda memberikan angka tingkat ekspresi α -SMA yang berbeda pula (Gambar 5.2). Maka itu, perbedaan ini semakin menunjukkan peran subkultur dalam meregulasi perubahan (peningkatan) tingkat ekspresi α -SMA. Pada penelitian ini pula ternyata subkultur III menunjukkan respon yang berbeda terhadap pemberian TGF- β 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 (Vaughan *et.al.*, 2000, 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.

Selama ini, penelitian-penelitian yang dilakukan menunjukkan hubungan sebab-akibat yang jelas antara pemberian TGF- β dengan diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas (Ji *et.al.*, 2014 dan Martin *et.al.*, 2015). Namun, peran dari

growth factor lainnya belum diteliti secara lebih lanjut. Salah satu penelitian yang melihat peran *growth factor* lain dilakukan oleh Svystonyuk *et.al.* pada tahun 2015, yaitu melihat peran *Fibroblast growth factor-2*, yang ternyata justru menunjukkan penurunan remodeling myofibroblas yang diinduksi oleh TGF- β . Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Tumelty tahun 2014 menunjukkan sebuah *signaling* di luar pengaruh TGF- β (TGF- β -*independent pathway*) pada proses diferensiasi myofibroblas, namun bukan dilihat dari tingkat ekspresi α -SMA nya, melainkan dari produksi kolagennya. Dapat disimpulkan bahwa dari penelitian-penelitian yang sudah dilakukan, peran TGF- β cukup besar dalam menginduksi diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas, namun masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut yang perlu dilakukan pada jaringan soket kontraktur orbita.

6.4 Hubungan Tingkat Ekspresi α -SMA antara Subkultur tanpa *Growth Factor* dengan Subkultur dengan TGF- β 10ng/mL

Hipotesis awal dari peneliti yaitu ingin mengamati penurunan tingkat ekspresi α -SMA akibat subkultur, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol yang akan memberikan gambaran tingkat ekspresi α -SMA yang sama pada tiap-tiap subkulturnya. Pemberian TGF- β dengan dosis 10ng/mL mengacu pada penelitian-penelitian sebelumnya untuk menginduksi peningkatan tingkat ekspresi atau kadar α -SMA, meskipun belum ada dosis terstandarisasi yang dijadikan patokan dalam menginduksi perubahan fibroblas menjadi myofibroblas (yang ditandai peningkatan tingkat ekspresi α -SMA) (Hinz *et.al.*, 2001, Walker *et.al.*, 2001, dan Untergasser *et.al.*, 2005). Mengacu pada Grafik 5.2, ternyata dapat dilihat bahwa pemberian TGF- β 10ng/mL tidak mampu menjaga kondisi (*environment*) pro-fibrotik pada jaringan yang dilakukan subkultur. Ternyata ditemukan pula bahwa TGF- β 1 konsentrasi tinggi (10ng/mL) mampu

meningkatkan jumlah apoptosis sel katup jantung *in vitro* (Walker *et.al.*, 2004). Hal ini dapat menjelaskan penurunan kadar α -SMA pada kelompok subkultur III.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Kekurangan penelitian ini yaitu tidak adanya pengamatan morfologi myofibroblas maupun pengukuran tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan kultur primer sebelum dilakukan subkultur, sehingga tidak bisa dilakukan perbandingan antara sebelum dan setelah dilakukan subkultur.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, yaitu subkultur sebanyak tiga kali pada jaringan soket kontraktur orbita, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Subkultur sebanyak dua kali dari kultur primer belum menunjukkan perubahan tingkat ekspresi α -SMA yang signifikan pada biakan jaringan soket kontraktur orbita, sedangkan subkultur sebanyak tiga kali dari kultur primer mampu menunjukkan perubahan tingkat ekspresi α -SMA yang signifikan pada biakan jaringan soket kontraktur orbita.
2. Subkultur masih belum bisa berperan sebagai metode penelitian yang memberikan lingkungan pertumbuhan baru bagi sel/jaringan jika terbatas pada dua kali subkultur setelah kultur primer.
3. TGF- β dalam dosis 10ng/mL kurang berpengaruh dalam peningkatan tingkat ekspresi α -SMA pada subkultur jaringan soket kontraktur orbita yang dilakukan sebanyak tiga kali, jika dibandingkan dengan subkultur tanpa pemberian TGF- β .
4. TGF- β dosis 10ng/mL memberikan pengaruh yang berbeda pada jumlah subkultur yang berbeda pula, yaitu satu kali, dua kali, dan tiga kali.
5. Kemungkinan terdapat pengaruh *growth factor* lain di luar TGF- β yang menyebabkan tetap berlangsungnya pertumbuhan myofibroblas di luar jaringan soket kontraktur dalam orbita, yaitu ketika pada media subkultur.

6. Kemungkinan terdapat peran *growth factor* lain yang mempengaruhi pertumbuhan myofibroblas sebagai sel pro-fibrotik pada jaringan soket kontraktur orbita.

7.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini, maka terdapat saran yang perlu dipertimbangkan:

7.2.1 Bagi peneliti selanjutnya

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui *growth factor* lain yang berperan dalam perkembangan dan *survival* sel myofibroblas pada jaringan soket kontraktur orbita, sehingga dapat diketahui lebih dalam mengenai penyebab terjadinya fibrosis dan skar yang mengganggu pemasangan protesa pada pasien soket kontraktur orbita. Diperlukan pula pengamatan morfologi myofibroblas maupun pengukuran tingkat ekspresi α -SMA pada jaringan kultur primer sebelum dilakukan subkultur, sehingga dapat dilakukan perbandingan antara sebelum dan setelah dilakukan subkultur. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lain secara biomolekuler terhadap jaringan soket kontraktur orbita dalam rangka melihat peran dari *growth factor* selain TGF- β , dan apabila tetap menggunakan TGF- β , perlu adanya penyesuaian ulang dalam menentukan dosis TGF- β yang akan digunakan dalam penelitian. Kemudian, peran subkultur sebagai metode penelitian yang memberikan lingkungan pertumbuhan baru bagi sel/jaringan masih perlu diteliti lebih lanjut, termasuk jumlah subkultur yang sesuai, yaitu jumlah minimal dan maksimal suatu subkultur dilakukan agar pertumbuhan sel tetap adekuat namun tidak mengalami perubahan fenotipe dan genotipe.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari, R.K., Khazai, H. and Usha, K.D., 2007. Prospective evaluation of contracted sockets.
- bin Jamayet, N., Johari, Y., Alam, M.K. and Husein, A., 2015. Expansion of a Contracted Eye Socket by Ocular Prosthesis: An Alternative Prosthetic Approach to Correct the Post Enucleation Socket Syndrome. *OHDM*, 14(3).
- Brissett, A.E. and Sherris, D.A., 2001. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. *Facial plastic surgery*, 17(04), pp.263-272.
- Caraci, F., Gili, E., Calafiore, M., Failla, M., La Rosa, C., Crimi, N., Sortino, M.A., Nicoletti, F., Copani, A. and Vancheri, C., 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*, 57(4), pp.274-282.
- Cushing, M.C., Liao, J.T. and Anseth, K.S., 2005. Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor- β 1 interactions with matrix molecules. *Matrix Biology*, 24(6), pp.428-437.
- Czubryt, M.P., 2012. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(1), p.19.
- Darby, I.A., Laverdet, B., Bonté, F. and Desmoulière, A., 2014. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, p.301.
- Dave, J.M. and Bayless, K.J., 2014. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*, 21(4), pp.333-344.
- Dodi, A.E., Huang, S.K., Ajayi, O., Sisson, T.H. and Horowitz, J.C., 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.

- Enoch, S., Moseley, R., Stephens, P. and Thomas, D.W., 2008. The oral mucosa: a model of wound healing with reduced scarring. *Oral Surgery*, 1(1), pp.11-21.
- Falke, L.L., Gholizadeh, S., Goldschmeding, R., Kok, R.J. and Nguyen, T.Q., 2015. Diverse origins of the myofibroblast [mdash] implications for kidney fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 11(4), pp.233-244.
- Garber, K., 2013. At the frontiers of lung fibrosis therapy: despite recent failures, a flurry of activity in biotech and pharma is raising hopes that an effective drug for this fatal lung disease is on the way. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.781-784.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G. and Chaponnier, C., 2001. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular biology of the cell*, 12(9), pp.2730-2741.
- Ji, H., Tang, H., Lin, H., Mao, J., Gao, L., Liu, J. and Wu, T., 2014. Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomedical reports*, 2(6), pp.787-792.
- Kimmel, H.M., Grant, A. and Ditata, J., 2016. The Presence of Oxygen in Wound Healing. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 28(8), pp.264-270.
- Kinner, B. and 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), pp.233-241.
- Kinman, N., Francoz, C., Barbu, V., Wendum, D., Rey, C., Hultcrantz, R., Poupon, R. and Housset, C., 2003. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Laboratory investigation*, 83(2), pp.163-173.
- Koh, T.J. and DiPietro, L.A., 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13.

- Kurtul, B.E., Erdener, U., Mocan, M.C., Irkeç, M. and 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), p.340.
- Manapov, F., Muller, P. and 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), pp.814-822.
- Martin, J., Midgley, A., Meran, S., Woods, E., Bowen, T., Phillips, A.O. and Steadman, R., 2016. Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene 6 (TSG-6)-mediated Interactions with the Inter- α -inhibitor Heavy Chain 5 Facilitate Tumor Growth Factor β 1 (TGF β 1)-dependent Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(26), pp.13789-13801.
- Mavrikakis, I., Malhotra, R., Shelley, M.J. and Sneddon, K.J., 2006. Surgical management of the severely contracted socket following reconstruction. *Orbit*, 25(3), pp.215-219.
- Meyer-ter-Vehn, T., Sieprath, S., Katzenberger, B., Gebhardt, S., Grehn, F. and Schlunck, G., 2006. Contractility as a Prerequisite for TGF- β -Induced Myofibroblast Transdifferentiation in Human Tenon Fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(11), pp.4895-4904.
- Moore, K.L., Dalley, A.F. and Agur, A.M., 2013. Clinically oriented anatomy. Lippincott Williams & Wilkins, pp.889-891.
- Petrelli, R.L., 1982. Management of the contracted eye socket. *International ophthalmology*, 5(1), pp.33-42.
- Poonyathalang, A., Preechawat, P., Pomsathit, J. and Mahaisaviriya, P., 2005. Reconstruction of contracted eye socket with amniotic membrane graft. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, 21(5), pp.359-362.
- Sandhu, S.V., Gupta, S., Bansal, H. and Singla, K., 2012. Collagen in health and disease. *J Orofac Res*, 2(3), pp.153-59.

- ScienCell Research Laboratories. Human Dermal Fibroblasts-adult. [online] <http://www.sciencellonline.com/products-services/primary-cells/human-dermal-fibroblasts-adult.html>. Diakses pada 18 Juli 2017.
- Serpero, L., Petecchia, L., Sabatini, F., Giuliani, M., Silvestri, M., Di Blasi, P. and Rossi, G.A., 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.
- Smith RS, Malet T. 2008. Auricular cartilage grafting to correct lower conjunctival fornix retraction and eyelid malposition in anophthalmic patients. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 24:13–18.
- Soll, D.B., 1982. The anophthalmic socket. *Ophthalmology*, 89(5), pp.407-423.
- Svystonyuk, D.A., Ngu, J.M., Mewhort, H.E., Lipon, B.D., Teng, G., Guzzardi, D.G., Malik, G., Belke, D.D. and Fedak, P.W., 2015. Fibroblast growth factor-2 regulates human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling. *Journal of translational medicine*, 13(1), p.147.
- Tawfik, H.A., Raslan, A.O. and Talib, N., 2009. Surgical management of acquired socket contracture. *Current opinion in ophthalmology*, 20(5), pp.406-411.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. and Brown, R.A., 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(5), p.349.
- Tumelty, K.E., Smith, B.D., Nugent, M.A. and Layne, M.D., 2014. Aortic carboxypeptidase-like protein (ACLP) enhances lung myofibroblast differentiation through transforming growth factor β receptor-dependent and-independent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5), pp.2526-2536.
- Untergasser, G., Gander, R., Lilg, C., Lepperdinger, G., Plas, E. and 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.
- Vaughan, M.B., Howard, E.W. and Tomasek, J.J., 2000. Transforming growth

factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Experimental cell research*, 257(1), pp.180-189.

Wakatsuki, T., Kolodney, M.S., Zahalak, G.I. and Elson, E.L., 2000. Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. *Biophysical journal*, 79(5), pp.2353-2368.

Walker, G.A., Masters, K.S., Shah, D.N., Anseth, K.S. and Leinwand, L.A., 2004. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor- β . *Circulation research*, 95(3), pp.253-260.

Webb, M.C., 2010. Issues in the management of the anophthalmic socket: Clinical, comfort, and cosmetic. *Ophthalmology Rounds*, 8, pp.1-6.

Lampiran 1

1. Hasil Uji Analisis Kelompok Perlakuan

a. Uji Normalitas

Tests of Normality

Subkultur	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
AlfaSMA 1.00	.143	5	.200*	.987	5	.970
2.00	.287	5	.200*	.764	5	.040
3.00	.313	5	.123	.848	5	.189

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

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Kruskal-Wallis

Test Statistics^{a,b}

	AlfaSMA
Chi-Square	10.500
df	2
Asymp. Sig.	.005

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Subkultur

c. Uji Mann-Whitney

i. Subkultur 1 dengan 2

Test Statistics^a

	AlfaSMA
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.117
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 ^b

a. Grouping Variable:
Subkultur

b. Not corrected for ties.

ii. Subkultur 1 dengan 3

Test Statistics^a

	AlfaSMA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable:
Subkultur

b. Not corrected for ties.

iii. Subkultur 2 dengan 3

Test Statistics^a

	AlfaSMA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable:
Subkultur

b. Not corrected for ties.

2. Hasil Uji Analisis Kelompok Kontrol

a. Uji Normalitas

Tests of Normality

SubkulturTGF	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ASMA 4.00	.321	5	.101	.824	5	.125
5.00	.315	5	.117	.897	5	.394
6.00	.306	5	.141	.887	5	.341

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ASMA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.775	2	12	.483

c. Uji ANOVA

ANOVA

ASMA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1375.569	2	687.784	38.836	.000
Within Groups	212.519	12	17.710		
Total	1588.088	14			

d. Uji Post-hoc Tukey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ASMA

Tukey HSD

(I) SubkulturTGF	(J) SubkulturTGF	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4.00	5.00	-5.57600	2.66157	.133	-12.6767	1.5247
	6.00	16.94400*	2.66157	.000	9.8433	24.0447
5.00	4.00	5.57600	2.66157	.133	-1.5247	12.6767
	6.00	22.52000*	2.66157	.000	15.4193	29.6207
6.00	4.00	-16.94400*	2.66157	.000	-24.0447	-9.8433
	5.00	-22.52000*	2.66157	.000	-29.6207	-15.4193

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

3. Hasil Uji Analisis *Independent T-test*

a. Subkultur 1 Antar Kelompok

		Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
AlfaSMA	Equal variances assumed	.189	.675	.090	8	.931	.18000	2.00932	-4.45351	4.81351	
	Equal variances not assumed			.090	7.829	.931	.18000	2.00932	-4.47117	4.83117	

b. Subkultur 2 Antar Kelompok

		Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
AlfaSMA	Equal variances assumed	2.271	.170	.775	8	.460	3.52600	4.54687	-6.95910	14.01110	
	Equal variances not assumed			.775	7.412	.462	3.52600	4.54687	-7.10567	14.15767	

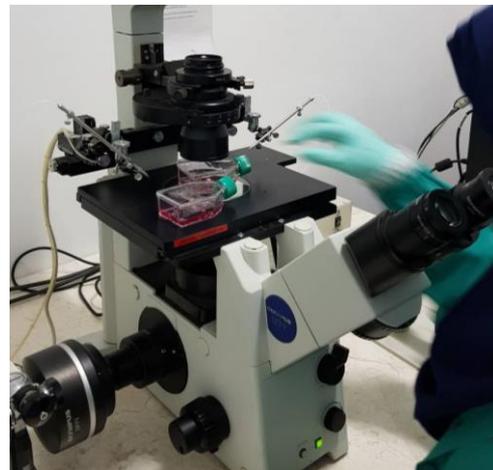
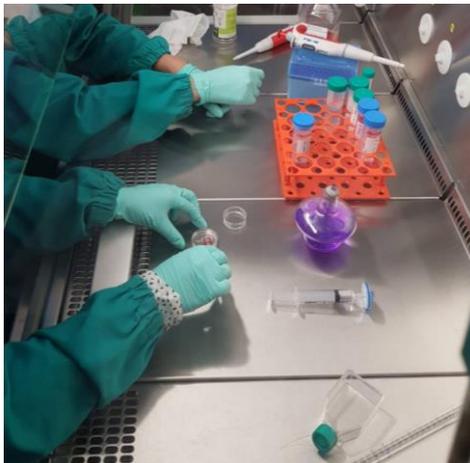
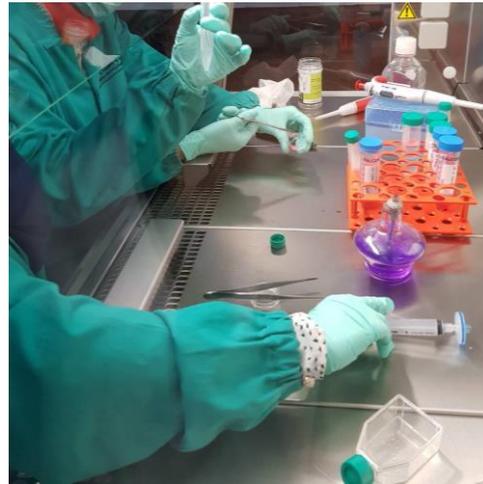
c. Subkultur 3 Antar Kelompok

		Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
AlfaSMA	Equal variances assumed	1.968	.198	11.703	8	.000	42.08200	3.59592	33.78980	50.37420	
	Equal variances not assumed			11.703	5.017	.000	42.08200	3.59592	32.84782	51.31618	

Lampiran 2

Dokumentasi Penelitian

1. Persiapan Kultur



2. Perlakuan Subkultur



3. Pemberian TGF- β pada media



4. Pemberian antibodi anti- α -SMA, Immunofluorescence, dan Pengamatan Hasil

