

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

**MEKANISME KEMATIAN SEL EPITEL KORNEA OLEH KARENA INFEKSI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA MELALUI ANALISIS EKSPRESI CASPASE-1,
TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 PADA MODEL TIKUS (*Rattus norvegicus*)**



ISMI ZUHRIA

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME KEMATIAN SEL EPITEL KORNEA OLEH KARENA INFEKSI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA MELALUI ANALISIS EKSPRESI CASPASE-1,
TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 PADA MODEL TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

ISMI ZUHRIA

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**MEKANISME KEMATIAN SEL EPITEL KORNEA OLEH KARENA INFEKSI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA MELALUI ANALISIS EKSPRESI CASPASE-1,
TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 PADA MODEL TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

DISERTASI

Untuk Memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
dan Dipertahankan di Hadapan Panitia Ujian Akhir

Tahap 2 (Terbuka)

Hari : Selasa
Tanggal : 3 November 2020
Pukul : 10.00 WIB

ISMI ZUHRIA

NIM 011317017324

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

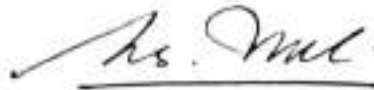
DISERTASI

**MEKANISME KEMATIAN SEL EPITEL KORNEA OLEH KARENA INFEKSI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA MELALUI ANALISIS EKSPRESI CASPASE-1,
TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 PADA MODEL TIKUS (*Rattus norvegicus*)**

YANG TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 23 September 2020

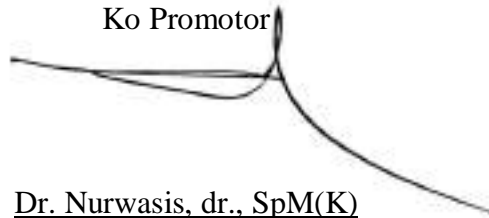
Oleh

Promotor



Prof. Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS, SpMK(K)
NIP. 195102211978021001

Ko Promotor



Dr. Nurwasis, dr., SpM(K)
NIP. 195806191986111001

Mengetahui,

KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor



Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr. M.Sc., Sp.PD-KR, FINASIM
NIP. 195007011977031001

Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai

oleh panitia penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)

pada tanggal 23 September 2020

Panitia Penguji:

- Ketua :**
1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si
 2. Prof. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., Sp.MK
 3. Dr. Nurwasis, dr., SpM(K)
 4. Prof. Dr. dr. Winarto, DMM., Sp.MK., Sp.M(K)
 5. Dr. Windhu Purnomo, dr., M.S
 6. Dr. Reny I'tishom., M.Si
 7. Dr. Nyilo Purnami, dr., Sp.THT-KL(K)., FICS., FISCAM

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Robbil Alamin, segala puji bagi Allah Tuhan Yang Maha Kuasa, Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayahNya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan. Tidak lupa sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW.

Disertasi ini dapat diselesaikan tidak lepas dari bimbingan, arahan, saran serta koreksi perbaikan dari promotor, ko-promotor, penguji serta pembimbing yang lain. Pada kesempatan ini perkenankan saya untuk mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., M.S., SpM (K) sebagai promotor dan guru saya yang dengan penuh perhatian, pengertian dan kesabaran memberikan dukungan mental, meluangkan waktu untuk diskusi, memberi bimbingan dan masukan pada penelitian ini sampai penulisan disertasi ini dapat diselesaikan. Saya menyampaikan terima kasih tak terhingga.

Dr. Nurwasis, dr., SpM (K) sebagai ko-promotor yang memberikan dukungan mental, meluangkan waktu untuk diskusi dan memberi masukan serta arahan untuk penelitian ini, terutama di bidang ilmu kesehatan mata. Saya menyampaikan terima kasih sebesar besarnya.

Prof. Musbadiany Yogiantoro, dr., SpM (K) selaku pembimbing akademik, guru dan sosok keibuan yang hangat, penuh pengertian, perhatian dan sabar, telah memberikan dukungan mental dan semangat, serta memberikan masukan dan bimbingan pada penelitian saya sehingga penelitian dan disertasi ini dapat diselesaikan.

Selain nama-nama tersebut, penelitian ini juga mendapat bantuan yang berharga dari berbagai pihak lain. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada:

Prof. Dr. Moh. Nasih, SE, MT, AK., CMA selaku rektor Universitas Airlangga, atas fasilitas pendidikan dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti dan menyelesaikan gelar Doktor pada program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K) selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. David S. Perdanakusuma, dr., Sp.BE-RE(K) selaku Wadek I dan Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr., MS., Prof. Dr. Budi Santoso, dr., SpOG(K) selaku Wadek II dan Prof. Dr. Ni Made Mertuningsih, dr., MS., SpMK selaku Wadek III, serta seluruh jajaran yang telah memberikan kesempatan kepada saya seluas-luasnya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Ucapan selamat juga kami haturkan kepada Prof. Dr. Budi Santoso, dr., SpOG(K) selaku dekan baru Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Dr. Achmad Chusnu R, dr., SpTHT-KL(K), FICS selaku Wadek I baru, Dr. Hanik Badriyah, dr., SpS(K) selaku Wadek II baru, dan Dr. Sulistiawati, dr., M.Kes selaku Wadek III baru.

Dr. Joni Wahyuhadi, dr. SpBS(K) selaku direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah memberi kesempatan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., MSc., Sp.PD-KR sebagai KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas motivasi dan fasilitas yang diberikan dalam menjalani dan menyelesaikan tahapan pendidikan Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Tim penguji mulai dari ujian kualifikasi, usulan penelitian dan penilaian naskah disertasi: Prof. Dr. Winarto, DMM, Sp.MK, SpM(K), Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., SpM (K), Prof. Dr.

Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., Sp.Par (K), Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., MSi, Dr. Windhu Poernomo, MSc., Dr. Bambang Purwanto, dr., Msi., Dr. Nurwasis, dr., SpM(K), Dr. Reny I'tishom, M.Si, Dr. Nyilo Purnami, dr., Sp THT-KL(K), FICS, FISCAM.

Staf pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga: Prof. Dr. Purnomo Suryohusodo, dr., SpBK, Prof. Dr. Soehartono Taat Putra, dr., MS, Prof. Dr. Harjanto J.M, dr., AIF, Prof. Dr. Zainuddin, Apt., Dr. PH Widodo J.P., dr., MPH, Dr.PH, Sri Pariani, dr., MS., MSc., PhD, Dr. Sunaryo, dr., MS., MSc., Dr. F. Sustini, dr., MS, Toetik Koesbardiati, Dra, PhD, Dr. Gondo Mastutik, drh., MKes, dan staf pengajar lainnya yang memberikan ilmu pengetahuan yang berharga bagi peneliti dalam menyelesaikan penelitian dan disertasi.

Prof. Dr. Widjiati, drh., Msi. yang telah memberikan bimbingan, fasilitas, dan konsultasi dalam penelitian dengan hewan coba.

Dr. Agung Widodo, dr., MKes yang memberi semangat, motivasi, ide dan bimbingan penelitian dalam bidang biomolekular dan imunologi sehingga membantu penyelesaian disertasi ini.

Tania Ardiani, dra., MS, Endah Sujani, S.Si, Ayunda Rizky F, S.KM, Ari Wahyudiono, Amd.A , bapak Muchid, bapak Hery, bapak Choirul yang telah membantu terlaksananya penelitian ini khususnya dalam pemeriksaan imunohistokimia.

Terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada guru dan sejawat di Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo Surabaya: Prof. Rowena Ghazali Hoesin, dr., SpM(K), MARS, Prof. Sjamsu Budiono, dr., Sp.M(K), Moestidjab, dr., SpM-KVR, Djiwatmo, dr., Sp.M(K), Prillia Tri Suryani Ardhana, dr., Sp.M(K), Prof. Dr. Hendrian Dwikoloso Soebago, dr., Sp.M(K), Gatot Soehartono, dr.,

Sp.M(K), Harijo Wahjudi Budi Susilo, dr., Sp.M(K), Eddyanto, dr., Sp.M(K), Dr. Evelyn Komaratih, dr., Sp.(K), Ratna Doemilah, dr., Sp.M(K), Dr. Wimbo Sasono, dr., Sp.M(KVR), Yulia Primitasati, dr., Sp.M(K), M. Firmasjah, dr., Sp.M(K), Dr. Reni Prastyani, dr., Sp.M, MKes, Rozalina Loebis, dr., Sp.M(K), Dicky Hermawan, dr., Sp.M(K), Indri Wahyuni, dr., Sp.M(K), Christina Aritonang, dr., Delfitri, dr., SpM(K), Sp.M(K), Sauli Ari Widjaja, dr., Sp.M(K), Soetjipto, dr., SpM(K), Susy Fatmariyanti, dr., Sp.M(K), Ima Yustiarini, dr., Sp.M, dan Ady, dr., Sp.M, Randi Montana, dr., SpM (alm).

Teman-teman seperjuangan di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2013 yang selalu kompak dan semangat, motivasi dan kebersamaan dalam menambah khazanah ilmu pengetahuan sehingga dapat membantu penyelesaian disertasi ini. Dr. Lukisian Agustini dr., Sp.M(K) dan Luki Indraswati, dr., Sp.M(K) yang telah setia menemani saya pada setiap tahapan ujian yang saya lalui. Persaudaraan dan kebersamaan yang tidak terlupakan semoga tetap terjaga di masa mendatang.

Sahabat saya Dr. Titiek Ernawati, dr, SpM (K) yang selalu memberikan semangat, nasehat, dan doa sampai disertasi ini dapat diselesaikan, terima kasih saya yang tak terhingga.

Akhirnya pada kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang dari lubuk hati terdalam kepada orang tua saya Bapak H. M. Soleh (Alm) dan Ibu Maimunah yang telah mengasuh, membesarkan dan mendidik dengan kasih sayang, semoga Allah SWT memberi tempat terbaik dan kasih sayangNya. Mertua saya Mochammad Ma'sum (Alm) dan Ibu Mascheyah yang telah mendampingi dan membimbing hidup saya dengan kasih sayangg. Kepada suami saya tercinta Ir. Moch Ni'am dan anak-anak saya tercinta Muhammad Isam Masykur dan Muhammad Dhany Latief, saudara-saudara kandung saya terima kasih atas dukungan, pengertian dan kesabaran sehingga pendidikan ini dapat diselesaikan.

Terima kasih saya sampaikan pada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan yang telah memberi motivasi dan membantu hingga disertasi ini selesai.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi saya, bagi kemajuan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran terutama Ilmu Kesehatan Mata, bagi pasien divisi Infeksi Imunologi serta anak didik saya. Semoga Allah melimpahkan taufik dan hidayahNya kepada pihak-pihak yang membantu penyelesaian disertasi ini.

Amiin Ya Robbal Alamin

Penulis

RINGKASAN

MEKANISME KEMATIAN SEL EPITEL KORNEA OLEH KARENA INFEKSI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MELALUI ANALISIS EKSPRESI CASPASE-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 PADA MODEL TIKUS (*Rattus Norvegicus*)

Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada kornea merupakan kondisi yang mengancam penglihatan, onsetnya cepat, menyebabkan peradangan stroma secara progresif selanjutnya terjadi pembuburan kornea dan perforasi kornea yang akhirnya dapat menimbulkan kebutaan dan kehilangan integritas bola mata. Sel epitel kornea berperan penting sebagai “barrier” terhadap stimulus dari luar, jika terdapat defek pada epitel kornea, bakteri termasuk *Pseudomonas aeruginosa* dapat menginfeksi kornea dan menyebabkan peradangan/ keratitis yang parah. Keratitis yang disebabkan *Pseudomonas aeruginosa* dapat terjadi setelah trauma, operasi mata, dan pada pemakai lensa kontak.

Pseudomonas aeruginosa termasuk menjadi penyebab terbanyak keratitis infeksius parah yang sering berakhir dengan kebutaan. Srinivasan pada tahun 2012 menyatakan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* menjadi penyebab keratitis bakterial sebesar 6-39% kasus di Amerika dan 8-21% di India Selatan. Data di Indonesia diperoleh dari RS Cipto Mangunkusumo-Jakarta didapatkan 25% kasus *Pseudomonas aeruginosa* dari 220 kasus keratitis (Asrorudin *et al.*, 2015), sedangkan di RSUD Dr. Soetomo-Surabaya didapatkan sebesar 26% dari 53% kasus dengan hasil kultur positif (Tunggadewi *et al.*, 2018).

Pseudomonas aeruginosa secara intrinsik resisten terhadap sejumlah besar antibiotik sehingga terapi menjadi sulit, dan masih banyak pertanyaan-pertanyaan yang belum terjawab tentang bagaimana dan kapan faktor-faktor virulensi yang telah ditemukan terlibat dalam patogenesis infeksi pada kornea. Sampai saat ini belum diketahui mekanisme kematian sel epitel kornea yang jelas oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis mekanisme kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* melalui analisis ekspresi caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3 dan caspase-3. Jenis penelitian ini adalah *true experimental* menggunakan rancangan *randomized post test only with control group design* pada kornea hewan coba tikus. Sebanyak 53 ekor tikus dibagi menjadi 2 kelompok dengan masing-masing kelompok 6 kontrol dan 6 kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan kornea tikus diinsisi dan diinokulasi kuman *Pseudomonas aeruginosa* sebanyak 2×10^6 CFU/ml dalam takaran 5 μ l, sedang pada kelompok kontrol hanya diinsisi kornea. Pada kedua kelompok ditunggu dalam jangka waktu 1 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, setelah itu mata tikus dienukleasi dan tikus dikorbankan untuk pemeriksaan jaringan. Dua ekor tikus dikorbankan pada hari pertama untuk melihat homogenitas. Ekspresi caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, caspase-3 diperiksa dengan metode imunohistokimia. Data yang terkumpul dianalisis dengan uji statistik menggunakan analisis multivariat dan regresi.

Hasil penelitian dari analisis multivariat 12 kelompok dari masing-masing 6 kelompok kontrol dan 6 kelompok perlakuan menunjukkan RIPK1 mempunyai nilai F terbesar yaitu 34,846, diikuti TNF α dengan nilai 26,284, caspase-3 dengan nilai 19,362, RIPK3 dengan nilai 17,608, dan caspase-1 dengan nilai terendah 12,120. RIPK1 mempunyai pengaruh terbesar diduga oleh karena berperan penting sebagai kunci yang mengatur takdir dari sel yaitu mengontrol peradangan melalui TNF α . Jalur kausatik pasca inokulasi *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan peningkatan ekspresi variabel caspase-1 dengan p=0,006, TNF α dengan p= 0,000, caspase-3 dengan p=0,001, namun menyebabkan penurunan ekspresi RIPK3 dengan p=0,000. TNF α menyebabkan peningkatan ekspresi RIPK1 dengan p=0,000, RIPK1 menyebabkan peningkatan RIPK3 dengan p=0,000, namun TNF α tidak menyebabkan perubahan ekspresi caspase-3. Penurunan RIPK3 diduga oleh karena fungsi RIPK1 selain mencegah apoptosis, juga mencegah peningkatan RIPK3-*dependent lethality* oleh TRIF, selain itu aktivitas RIPK3 juga dapat dilemahkan oleh mutasi RIPK3RHIM.

Kesimpulan penelitian ini adalah inokulasi *Pseudomonas aeruginosa* pada kornea tikus menyebabkan peningkatan ekspresi caspase-1, TNF α , caspase-3, peningkatan RIPK1 melalui TNF α dan penurunan ekspresi RIPK3, merupakan biomarker utama dalam mekanisme kematian sel epitel kornea.

ABSTRAK

MEKANISME KEMATIAN SEL EPITEL KORNEA OLEH KARENA INFEKSI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MELALUI ANALISIS EKSPRESI CASPASE-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 PADA MODEL TIKUS (*Rattus Norvegicus*)

Latar Belakang: *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu penyebab utama keratitis parah yang dapat menyebabkan peradangan progresif dengan onset yang cepat, kerusakan jaringan yang permanen, dan akhirnya menyebabkan kebutaan dan kerusakan integritas kornea. Faktor-faktor dan mekanisme virulensi infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada sel epitel kornea penting diketahui untuk mencegah progresivitas, peningkatan kesembuhan, dan menurunkan komplikasi perforasi kornea.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mekanisme kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* melalui analisis ekspresi caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, dan caspase-3.

Metode: Rancangan penelitian menggunakan *randomized post-test only with control group design*. Sebanyak lima puluh tiga tikus Wistar dibagi menjadi 2 kelompok, dengan masing-masing kelompok 6 kontrol dan 6 perlakuan. Pada kelompok perlakuan, kornea diinsisi tiga baris paralel 3mm dengan jarum steril nomer 26, selanjutnya diinokulasi dengan kuman *Pseudomonas aeruginosa* secara topikal sebanyak 2×10^6 CFU/ml dalam 5 μ l, sedangkan pada kelompok kontrol hanya diinsisi tiga baris paralel. Pada kedua kelompok ditunggu pada jangka waktu 1 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam untuk diterminasi dan dienukleasi, selanjutnya dilakukan pemeriksaan histologi dan imunohistokimia.

Hasil: *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan kenaikan ekspresi caspase-1 ($p = 0.006$), TNF α ($p = 0.000$), caspase-3 ($p = 0.061$), dan penurunan ekspresi RIPK3 ($p = 0.047$). TNF α menyebabkan kenaikan ekspresi RIPK1 ($p = 0.000$), RIPK1 menyebabkan kenaikan ekspresi RIPK3 ($p = 0.000$), sedangkan TNF α tidak menyebabkan perubahan ekspresi caspase-3 ($p = 0.141$).

Kesimpulan: Infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada kornea tikus menunjukkan peningkatan ekspresi caspase-1, TNF α , caspase-3, peningkatan RIPK1 melalui TNF α , dan penurunan ekspresi RIPK3 pada 1 jam hingga 72 setelah inokulasi sebagai biomarker utama pada mekanisme kematian sel epitel kornea.

Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, sel epitel kornea, kematian sel, caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, caspase-3.

SUMMARY

**MECHANISM of CORNEAL EPITHELIAL CELLS DEATH by INFECTION of
PSEUDOMONAS AERUGINOSA through ANALYSIS EXPRESSION of CASPASE-1,
TNF α , RIPK1, RIPK3, CASPASE-3 in RATS MODEL**

Infection of *Pseudomonas aeruginosa* in the cornea is a potentially sight-threatening, rapid onset, leading progressive inflammation evenly corneal melting and perforation that cause blindness and damage corneal integrity. Corneal epithelial cells act as a barrier against outside stimuli, if they are defective, bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*, may infect the cornea and cause a severe inflammation. Keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* can occur after trauma, eye surgery and in contact lens wear associated with disturbance of the corneal epithelial integrity.

Pseudomonas aeruginosa causes severe infectious keratitis that leads to blindness the most. Srinivasan *et al.* (2012) stated that *Pseudomonas aeruginosa* causes 6-39% case of bacterial keratitis in America and 8-21% in South India. In Indonesia, data from Cipto Mangunkusumo Hospital-Jakarta stated that there were 25% from 220 keratitis cases (Asrorudin *et al.*, 2015) while at Dr. Soetomo Hospital-Surabaya stated that there were 26% from 53% of cases with positive culture result (Tunggadewi *et al.*, 2018).

Pseudomonas aeruginosa is intrinsically resistant to a large number of antibiotics, making treatment difficult and many questions not yet explained completely how and when virulence factors have been found involved in pathogenesis of infection. Currently, it is not yet known clearly mechanism of corneal epithelial cell death due to *Pseudomonas aeruginosa*.

The purpose of this research is to explain mechanism of corneal epithelial cell death cause by *Pseudomonas aeruginosa* infection through analysis expression of caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, and caspase-3. The type of this research is true experimental use randomized post test only with control group design. As many as 53 types of Wistar rats divided into 2 groups, each group consist of 6 control and treatment groups. The treatment groups received three corneal epithelial incisions and inoculated with 2×10^6 CFU/ml in 5 μ l *Pseudomonas aeruginosa* suspension, while in the control groups only received three corneal epithelial insicions. Both groups use waiting time 1 hour, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours, and 72 hours, after that the eyeball was enucleated and rat was terminated thus examine for histology and immunohistochemical staining examination. Two rats were terminated to see its homogeneity.

Expression of caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, caspase-3 were examined by immunohistochemistry methods. The collected data was analyzed with statistic tests using multivariate and regression analysis.

The study result of multivariate analysis from each 6 group of control and 6 group of treatment reveals that RIPK1 (F=34,846) has the most influence then followed by TNF α (F=26,284), caspase-3 (F=19,362), RIPK3 (F=17,608), and caspase-1 (12,120). Causatic path analysis after *Pseudomonas aeruginosa* inoculation causing increase expression of caspase-1

with $p=0.006$, $\text{TNF}\alpha$ with $p=0.000$, caspase-3 with $p=0.001$, while causing decrease expression of RIPK3 with $p=0.000$. $\text{TNF}\alpha$ causing increase expression of RIPK1 with $p=0.000$, RIPK1 causing increase expression of RIPK3, while $\text{TNF}\alpha$ not cause change of expression caspase-3 significantly. RIPK 1 is the most influence expected as a key destiny of cells that regulate inflammation through $\text{TNF}\alpha$. The decreasing of RIPK3 suggested it was cause by another function of RIPK1 that prevents increasing of RIPK3-TRIF dependent lethality. The kinase activity of RIPK3 is also attenuated when the RIPK3 RHIM is mutated.

Conclusion of this study is after inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* on corneal rats resulting increase of expression caspase-1, $\text{TNF}\alpha$, caspase-3, RIPK1 through $\text{TNF}\alpha$, and decrease of expression RIPK3 as prime biomarkers in corneal epithelial cell death.