

TESIS

**PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA
MESENKIMAL LIMBUS TERHADAP α - SMA DAN
KETEBALAN SKLERA PADA HEWAN MODEL
*FORM DEPRIVATION MYOPIA***

(Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)



Oleh:

MUHAMMAD RIZQY ABDULLAH

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD dr. SOETOMO
SURABAYA
2020**

TESIS

**PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA
MESENKIMAL LIMBUS TERHADAP α - SMA DAN
KETEBALAN SKLERA PADA HEWAN MODEL
*FORM DEPRIVATION MYOPIA***

(Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)

Oleh:

MUHAMMAD RIZQY ABDULLAH

NIM:

011718016303

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD dr. SOETOMO
SURABAYA
2020**

TESIS

**PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA
MESENKIMAL LIMBUS TERHADAP α -SMA DAN
KETEBALAN SKLERA PADA HEWAN MODEL
*FORM DEPRIVATION MYOPIA***

(Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelar Magister Kedokteran Klinik

(M.Ked.Klin)

Program Studi Ilmu Kesehatan Mata

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

MUHAMMAD RIZQY ABDULLAH

NIM:

011718016303

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD dr. SOETOMO
SURABAYA
2020**

PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Rizqy Abdullah
NIM : 011718016303
Program Studi : Magister Ilmu Kedokteran Klinik
Judul Tesis : Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenkimal Limbus Terhadap α -SMA dan Ketebalan Sklera Pada Hewan Model *Form Deprivation Myopia* (Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (Plagiarism) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan didalam daftar pustaka. Demikian, pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 5 November 2020



Muhammad Rizqy Abdullah
011718016303

Lembar Pengesahan

Menyetujui hasil laporan penelitian yang berjudul:

**PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA MESENKIMAL LIMBUS
TERHADAP α - SMA DAN KETEBALAN SKLERA PADA HEWAN MODEL
FORM DEPRIVATION MYOPIA
(Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)**

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelar Magister Kedokteran Klinik (M.Ked.Klin)
Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Oleh:

Muhammad Rizqy Abdullah, dr.

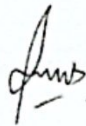
Pembimbing I



Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., Sp.M (K)

NIP. 19460212 197203 1 001

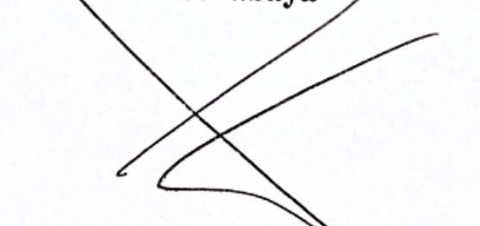
Pembimbing II



Rla Sandy Deneska., Sp.M (K)

NIP. 19750929 201410 2 001

**Mengetahui,
Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Surabaya**



Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp. A(K)
NIP. 19650227 199003 1 010

HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI TESIS

Laporan tesis ini diajukan oleh:

Nama : dr. Muhammad Rizqy Abdullah

NIM : 011718016303

Program Studi : Magister Ilmu Kedokteran Klinik/Ilmu Kesehatan Mata

Judul : Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenkimal Limbus Terhadap α -SMA dan Ketebalan Sklera Pada Hewan Model *Form Deprivation Myopia* (Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)

ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji

Program Studi Ilmu Kesehatan Mata Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo.

Pada tanggal 28 Desember 2020

Panitia Penguji,

1. Ketua Penguji : Dr. Evelyn Komaratih, dr., Sp. M (K)
2. Penguji : Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., Sp. M (K)
3. Penguji : Ria Sandy Deneska, dr., Sp. M (K)
4. Penguji : Dyah Fauziah, dr., Sp. PA (K)
5. Penguji : Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT dengan selesainya penyusunan hasil penelitian ini. Oleh karena itu, penulis menghaturkan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada yang terhormat:

1. **Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr. Sp.M(K)** sebagai pembimbing pertama yang selalu memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi serta referensi dan koreksi dalam penyusunan hasil penelitian ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
2. **Ria Sandy Deneska, dr. Sp.M(K)** sebagai pembimbing kedua selalu memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi serta referensi dan koreksi dalam penyusunan hasil penelitian ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
3. **Dyah Fauziah, dr. Sp.PA(K)** sebagai pembimbing patologi anatomi yang telah memberikan masukan dan referensi dalam bidang patologi anatomi sehingga penelitian dapat terselesaikan.
4. **Dr. Hari Basuki Notobroto, dr.M.Kes** sebagai konsultan statistik yang telah membantu dalam penyelesaian penyusunan hasil penelitian ini dan membantu dalam bidang statistika.
5. **Dr. dr. Nurwasis, SpM (K)** sebagai Ketua Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSU Dr. Soetomo Surabaya
6. **Dr. dr. Evelyn Komaratih, SpM(K)** sebagai Koordinator Program Studi PPDS I Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSU Dr. Soetomo Surabaya
7. **dr. Dicky Hermawan, SpM (K)** sebagai dosen wali yang selalu memberikan motivasi dalam penyusunan penelitian ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
8. **Para Guru Besar dan seluruh staf pengajar** Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSU Dr.

Soetomo Surabaya, yang telah banyak membimbing dan memberikan saran selama penyusunan penelitian ini.

9. Kedua orang tua penulis, Bapak **Muhammad Nadir Abdullah** dan Ibu **Rosita Heryani** yang telah memberikan bantuan materi dan doa, dorongan, serta semangat.
10. **dr. Atina Yustisia, Sp. M, dr. Denisa Rosati, dan tim Stem Cell Research Universitas Airlangga** yang telah membantu banyak dalam penyelesaian penelitian ini.
11. **Teman-teman sejawat PPDS I Ilmu Kesehatan Mata**, yang selalu memberikan dorongan, semangat, dan bantuan kepustakaan dalam penyusunan.

Surabaya, 5 November 2020

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TESIS UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai civitas akademika Universitas Airlangga, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Rizqy Abdullah, dr.

NIM : 011718016303

Program Studi : Ilmu Kesehatan Mata

Departemen : Pascasarjana

Fakultas : Kedokteran

Jenis Karya : Tesis

Dalam pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan Universitas Airlangga Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas tesis saya yang berjudul “Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenkimal Limbus terhadap α -SMA dan Ketebalan Sklera Pada Hewan Model *Form Deprivation Myopia* (Studi Eksperimental Pada *Oryctolagus cuniculus*)”.

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Airlangga berhak menyimpan, mengalihmediakan, mengelola dalam bentuk pangkalan data, merawat, dan mempublikasikan tesis saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 1 Desember 2020

Muhammad Rizqy Abdullah

RINGKASAN

PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA MESENKIMAL LIMBUS TERHADAP α -SMA DAN KETEBALAN SKLERA PADA HEWAN MODEL *FORM DEPRIVATION MYOPIA* (Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)

Muhammad Rizqy Abdullah, Gatut Suhendro, Ria Sandy Deneska, Dyah Fauziah,
Hari Basuki Notobroto, Atina Yustisia Lestari, Denisa Rosati

Secara global miopia merupakan penyebab utama dari *visual impairment* dan merupakan salah satu masalah yang penting di bidang mata. Prevalensi dari miopia meningkat tajam dalam beberapa dekade terakhir, menimbulkan kepedulian di bidang kesehatan masyarakat. Saat ini terdapat 153 juta orang pada usia lebih dari lima tahun yang menderita gangguan penglihatan disebabkan oleh miopia yang tidak terkoreksi dan kelainan refraksi lainnya (Lin et al,2016; Pan et al,2012).

Studi sebelumnya menjelaskan bahwa penyebab utama dari perkembangan miopia adalah akselerasi pertumbuhan lapisan sklera *postnatal*, terutama di bagian posterior sklera. Proses pemanjangan sumbu bola mata tersebut berhubungan dengan *remodeling* struktur matriks ekstraseluler pada sklera. Saat ini sklera menjadi salah satu target terapi dalam mencegah perkembangan miopia. Fibroblas pada sklera berperan penting dalam komunikasi sel dan matriks ekstraseluler sehingga menjaga keseimbangan dan degradasi dari matriks ekstraseluler dan mempertahankan integritas sklera (Lin *et al.*, 2016).

Salah satu strategi untuk terapi miopia yaitu dengan melakukan implantasi sel punca mesenkimal. Penggunaan sel punca mesenkimal awalnya didesain sebagai strategi untuk mengembalikan fungsi dari jaringan yang rusak. Pemberian sel punca mesenkimal limbus (SPML) pada hewan model miopia diduga dapat memberikan efek anabolik pada sklera, menurunkan efek penipisan sklera, mencegah pemanjangan sumbu bola mata, sehingga dapat menjadi salah satu

terapi pada kasus myopia. Pemberian sel punca dilakukan dengan injeksi intrasklera dengan kemungkinan menyebabkan keterlibatan sel tersebut dalam *signaling loop* retina-sclera (Janowski *et al.*, 2015).

Studi ini berfokus pada pengaruh pemberian sel punca mesenkimal limbus terhadap penebalan sklera posterior dan α -SMA sebagai marker *myofibroblast* pada hewan model *form deprivation myopia* (FDM). Hewan model New Zealand *rabbits* berusia 2-3 bulan dibagi menjadi tiga grup dengan jumlah delapan sampel tiap grup, yaitu grup kontrol, grup model FDM, dan grup model FDM dengan injeksi sel punca mesenkimal (FDM+SPML). Oklusi monokular pada mata hewan model dilakukan untuk menginduksi miopia. Oklusi dilakukan selama enam minggu, dengan diberikan injeksi sel punca mesenkimal limbus pada grup perlakuan pada minggu keempat. Sel punca disiapkan dengan metode isolasi dan kultur sesuai modifikasi pada studi yang dilakukan oleh Komaratih dkk. (2019). Isolasi dilakukan dengan metode semienzimatis. Media kultur primer diberikan suplementasi bFGF 5ng/mL. Sel punca positif terhadap ekspresi CD105, CD90, dan CD73. Pemeriksaan mikroskop imunoflorescen dilakukan untuk mengevaluasi migrasi SPML berlabel PKH26 ke sklera posterior. Sel punca mesenkimal diinjeksi pada lapisan intrasklera di arah jam 10, dengan jarak 2,5 mm dari posterior limbus. Pemeriksaan dengan pengecatan Hematoxylin Eosin dilakukan untuk mengukur ketebalan sklera. Pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi poliklonal untuk α -SMA digunakan untuk memeriksa ekspresi α -SMA. Selain itu parameter status refraksi dilakukan dengan streak retinoskopi dan pengukuran axial length pada minggu nol, empat, dan enam.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perubahan status refraksi dan axial length menjadi lebih miopia pada grup perlakuan model miopia (FDM). Hasil penelitian menunjukkan perbedaan signifikan pada hasil streak retinoskopi (NEITZ, Tokyo, Japan) pada semua grup di minggu keempat ($p=0,013$) dan minggu keenam ($p=0,001$). Nilai status refraksi pada grup FDM memiliki perbedaan signifikan pada evaluasi berkala ($p=0,001$) dan begitu juga dengan grup FDM+SPML ($p=0,001$). Hasil biometri menunjukkan perbedaan signifikan pada *axial length* pada grup kontrol ($p=0,021$), grup FDM ($p=0,001$), dan grup

FDM+SPML ($p=0,001$). Pemeriksaan minggu keenam menunjukkan perbedaan signifikan pada hasil *axial length* ($p=0,049$). Hasil menunjukkan peningkatan intensitas α - SMA dan ketebalan sklera pada grup model miopia (FDM). Pemberian sel punca mesenkimal limbus memberikan peningkatan intensitas α -SMA dan ketebalan sklera pada grup (FDM+SPML). Pemeriksaan ketebalan sklera posterior menunjukkan perbedaan signifikan pada ketiga grup ($p=0,025$). Pemeriksaan ketebalan sklera menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan FDM+SPML ($229,27 \mu\text{m} \pm 84,60$ dengan $293,37 \mu\text{m} \pm 50,47$; $p=0,010$, $p<0,05$). Pemeriksaan intensitas α - SMA menggunakan *immunoreactive score* (IRS) dengan perbedaan signifikan pada ketiga grup ($p=0,047$). Pemeriksaan intensitas α - SMA menunjukkan perbedaan signifikan pada grup kontrol dengan grup perlakuan FDM+SPML ($8,00 \pm 1,50$ dengan $12,00 \pm 0,00$, $p=0,038$; $p<0,05$). Berdasar penelitian ini didapatkan bukti bahwa terdapat pengaruh pemberian sel punca mesenkimal limbus terhadap ketebalan sklera posterior dan ekspresi α - SMA pada model miopia dengan FDM. Selain itu penelitian ini juga menunjukkan terdapat perubahan penebalan sklera dan peningkatan ekspresi α - SMA pada proses miopia dengan metode FDM. Mata miopia mengalami penipisan sklera yang diakibatkan oleh efek stress lokal dan degradasi kolagen, namun terdapat autoregulasi melibatkan efek sekunder yaitu peningkatan sintesis kolagen dengan cara diferensiasi fibroblas menjadi *myofibroblast* yang ditandai dengan marker α - SMA seperti yang dijelaskan oleh Backhouse dan Phillips (2010). Hal ini terbukti pada studi yang dilakukan. Pemberian sel punca berperan dalam peningkatan jumlah fibroblas yang berdiferensiasi menjadi *myofibroblast* dan meningkatkan sintesis kolagen sehingga menyebabkan penebalan sklera dan peningkatan ekspresi α - SMA seperti pada studi ini. Oleh karena itu penggunaan sel punca mesenkimal limbus pada terapi miopia dapat dipertimbangkan menjadi alternatif potensi terapi.

SUMMARY

EFFECT OF LIMBAL MESENCHYMAL STEM CELL INTRASCLERA INJECTION ON SMA AND SCLERAL THICKNESS IN FORM DEPRIVATION MYOPIA ANIMAL MODEL

(In Vivo Experimental Study in *Oryctolagus cuniculus*)

Muhammad Rizqy Abdullah, Gatut Suhendro, Ria Sandy Deneska, Dyah Fauziah,
Hari Basuki Notobroto, Atinya Yustisia Lestari, Denisa Rosati

Myopia is a global cause of visual impairment and one of important issues in ophthalmology. The prevalence of myopia has rapidly increased significantly in recent decades, resulting in a significant global public health concern. Globally, there are approximately 153 million people over the age of five years old suffering from visual defects caused by uncorrected myopia and other refractive errors (Lin *et al.*, 2016).

Previous study explained about the main cause of myopia development is due to postnatal accelerated growth development of scleral tissue, mainly at posterior part of sclera. Axial lengthening process was due to remodeling of extracellular matrix in sclera. Sclera is important tissue in accommodation. Sclera determines absolute size of eyeball with maintaining stable ocular dimensions. Fibroblast in sclera plays important role in cell communication and degradation of extracellular matrix and maintaining scleral integrity (Lin *et al.*, 2016).

One of strategy for myopia therapy is mesenchymal stem cell implantation. The use of mesenchymal stem cell is initially designed for recovering strategy the wounded tissue. The use of mesenchymal stem cell (MSC) in myopia animal model presumed in giving anabolic effect on sclera, reducing thinning process of sclera, and preventing axial lengthening, resulting in therapy of myopia. The usage of MSC is given intrasclera with the possibility involving in retina-sclera signaling loop. Since intrasclera injection is use as routine route in drug admission

without further complications, this route is preferred for stem cell implantation (Janowski *et al*, 2015).

This study is focusing in the usage of limbal MSC in posterior sclera thickness and α -SMA as myofibroblast marker in form deprivation myopia (FDM) animal model. New Zealand rabbit animal model age 3-4 months are divided into three groups with eight samples in each group which consist of control group, FDM model group, FDM with limbal MSC group (FDM+LMSC). Monocular occlusion at eye of animal model was used to induced myopia. Occlusion was done for six weeks, with LMSC injection was given at fourth weeks in third group. LMSC was prepared with isolation method and culture using modification method by Komaratih *et al*. (2019). Isolation was done with semi-enzymatic method. Primary media culture was given supplementation bFGF 5 ng/mL. Stem cell was positive with expression CD105, CD90, and CD73. Immunofluorescence microscope examination was done to evaluate LMSC with PKH26 labelling migration to posterior sclera. LMSC was injected intrasclera at 10 o'clock with 2,5 mm from posterior limbus. Hematoxylin eosin staining was done to evaluate scleral thickness under microscope examination. Immunohistochemistry was done with α -SMA antibody to evaluate α -SMA expression. Refraction status was evaluated with streak retinoscopy and axial length was checked at initial, fourth, and sixth week.

Results of the study showed there were changes of refraction status and axial length towards to be more myopic at FMD group. There were significant differences at streak retinoscopy (NEITZ, Tokyo, Japan) at all groups in fourth week ($p=0,013$) and sixth week($p=0,001$). There was significant difference in periodic evaluation of refraction status in FDM group ($p=0,001$). There was also significant difference in periodic evaluation of refraction status in FDM+LMSC group ($p=0,001$). Biometry results showed significant difference of axial length in control group ($p=0,021$), FDM group ($p=0,001$), and FDM+LMSC group($p=0,001$). Sixth week evaluation showed significant difference at axial length ($p=0,049$).

Results showed increased intensity of α -SMA and scleral thickness at myopia model group (FDM). Injection of LMSC showed increased intensity of α -SMA and scleral thickness at FDM+LMSC group. Posterior scleral thickness evaluation showed significant difference in all groups ($p=0,025$). Posterior scleral thickness evaluation showed significant difference between control group and FDM+LMSC group ($229,27 \mu\text{m} \pm 84,60$ and $293,37 \mu\text{m} \pm 50,47$; $p=0,010$, $p<0,05$). Evaluation of α -SMA use immuno-reactive score (IRS) with significant difference in all groups ($p=0,047$). There was significant difference between control group and FDM+LMSC group at α -SMA expression ($8,00 \pm 1,50$ and $12,00 \pm 0,00$, $p=0,038$; $p<0,05$).

Based on this study it was proven that there were effects of LMSC in scleral thickness and α -SMA expression in myopia animal model with FDM. This study also showed changes in scleral thickness and α -SMA expression in myopia animal model with FDM. There was scleral thinning in myopia process results from local stress and collagen degradation, but there was autoregulation involving secondary effects which increased collagen synthesis with fibroblast differentiation into myofibroblast marked with α -SMA as explained with Backhouse and Phillips (2010). This result is showed in our study. Injection of LMSC plays a role in increasing fibroblast which differentiate into myofibroblast and increasing collagen synthesis which results in increases of scleral thickness and α -SMA expression. This showed that LMSC needs to be considered as alternative potential therapy for myopia.

ABSTRAK

PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA MESENKIMAL LIMBUS TERHADAP α -SMA DAN KETEBALAN SKLERA PADA HEWAN MODEL *FORM DEPRIVATION MYOPIA*

(Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus cuniculus*)

Muhammad Rizqy Abdullah, Gatut Suhendro, Ria Sandy Deneska, Dyah Fauziah, Hari Basuki Notobroto, Atina Yustisia Lestari, Denisa Rosati

Latar Belakang: Untuk mengetahui kemampuan sel punca mesenkimal limbus (SPML) dalam mengurangi progres miopia hewan coba *form deprivation myopia*

Metode: Studi ini menggunakan kultur SPML dari kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dan diisolasi dengan metode modifikasi semienzimatis. 24 hewan coba dibagi dalam tiga grup yang terdiri dari grup kontrol, grup *form deprivation myopia* (FDM), dan grup *form deprivation myopia* dengan injeksi SPML (FDM+SPML). Model miopia didapatkan dengan oklusi monokular selama enam minggu. Injeksi SPML secara intrasklera diberikan pada minggu keempat oklusi. Status refraksi dievaluasi dengan streak retinoskopi dan *axial length* dilakukan dengan biometri a-scan. Setelah enam minggu, ekspresi α -SMA dan ketebalan sklera dievaluasi. Hasil tiap grup dianalisis dengan Kruskal-Wallis atau Mann-Whitney dengan *confidence interval* 95% ($p < 0,05$).

Hasil: Setelah empat minggu dilakukan oklusi, semua mata menjadi lebih miopia. Injeksi SPML dilakukan 2,5 mm posterior dari limbus dan evaluasi dua minggu menunjukkan SPML telah migrasi ke sklera posterior. Ekspresi α -SMA menunjukkan perbedaan signifikan diantara ketiga grup ($p < 0,05$). Ketebalan sklera menunjukkan perubahan signifikan diantara ketiga grup ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan signifikan ketebalan sklera dan ekspresi α -SMA antara grup kontrol dengan grup FDM+SPML.

Kesimpulan: SPML memiliki peran potensial sebagai kontrol miopia mata hewan coba *form deprivation* dengan meningkatkan α -SMA dan ketebalan sklera

Kata kunci: *Form deprivation myopia*, sel punca mesenkimal limbus, α - SMA, *myofibroblast*, ketebalan sklera

ABSTRACT

EFFECT OF LIMBAL MESENCHYMAL STEM CELL INTRASCLERA INJECTION ON α -SMA AND SCLERAL THICKNESS IN FORM DEPRIVATION MYOPIA ANIMAL MODEL

(In Vivo Experimental Study in *Oryctolagus cuniculus*)

Muhammad Rizqy Abdullah, Gatut Suhendro, Ria Sandy Deneska, Dyah Fauziah, Hari Basuki Notobroto, Atina Yustisia Lestari, Denisa Rosati

Purpose: To investigate the capability of limbal mesenchymal stem cell (LMSC) in reducing myopia progression in form deprivation myopia animal model

Material and methods: This study using cultured LMSC from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and isolated using modification of semienzymatic methods. 24 animal model divided into three groups, consists of control group, form deprivation myopia group (FDM), and form deprivation myopia group with LMSC injection (FDM+LMSC). Myopia model was achieved by monocular occlusion for six weeks. LMSC injection was done intrasclera during fourth week of occlusion. Refraction status was evaluated by streak retinoscopy and axial length was measured using a-scan biometry. After six weeks, α -SMA expression was evaluated as myofibroblast marker and scleral thickness was measured. The results between groups were analyzed using Kruskal-Wallis or Mann-Whitney with 95% confidence ($p < 0,05$).

Result: After four weeks of deprivation, all eyes became more myopic. LMSC injection was done 2,5 mm posterior from limbus and two week-evaluation showed LMSCs had migrated on posterior region of the sclera. α -SMA expression showed significant differences among three groups ($p < 0,05$). Scleral thickness also showed significant differences among three groups ($p < 0,05$). There were significant differences of scleral thickness and α -SMA expression between control and FDM+LMSC groups.

Conclusion: LMSC has potential role in myopia control in form deprivation eye animal model by increasing α -SMA and scleral thickness.

Keyword: Form deprivation myopia, limbal mesenchymal stem cell, α -SMA, myofibroblast, scleral thickness

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
HALAMAN PENGESAHAN PANITIA PENGUJI TESIS.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
HALAMAN PERSETUJUAN TESIS UNTUK PUBLIKASI	ix
RINGKASAN	x
<i>SUMMARY</i>	xiii
ABSTRAK	xvi
<i>ABSTRACT</i>	xvii
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR TABEL.....	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xxv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Miopia.....	5
2.1.1 <i>Form Deprivation Myopia</i> (FDM).....	6
2.2 Sklera.....	8
2.2.1 Perkembangan struktur sklera.....	9
2.2.2 Struktur sklera.....	10
2.2.3 Kolagen.....	14
2.2.4 α SMA.....	15
2.3 Sinyal Pertumbuhan pada Miopia	18
2.4 Perubahan Sklera pada Miopia.....	20
2.5 Sel Punca Mesenkimal	24
2.5.1 Sel punca mesenkimal limbus	26
2.5.2 Sel progenitor pada sklera	29

	2.5.3 Mekanisme kerja sel punca.....	29
	2.5.4 Potensi penggunaan sel punca pada miopia.....	30
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	32
	3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	32
	3.2 Hipotesis Penelitian	34
BAB 4	METODE PENELITIAN	35
	4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	35
	4.2 Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi	36
	4.2.1 Unit Eksperimen	36
	4.2.2 Replikasi	36
	4.2.3 Randomisasi.....	37
	4.3 Variabel Penelitian	38
	4.3.1 Variabel Bebas.....	38
	4.3.2 Variabel Tergantung	38
	4.3.3 Variabel Kendali	38
	4.4 Instrumen Penelitian.....	38
	4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	39
	4.5.1 Lokasi Penelitian	39
	4.5.2 Waktu Penelitian.....	40
	4.6 Definisi Operasional Variabel	40
	4.7 Analisa Data	41
BAB 5	HASIL PENELITIAN	43
	5.1 Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Limbus	43
	5.2 Migrasi dan <i>Engravingment</i> Sel Punca Mesenkimal Limbus.....	45
	5.3 Induksi Hewan Model <i>Form Deprivation Myopia</i>	46
	5.4 Pengaruh Injeksi Sel Punca Mesenkimal Limbus pada Ketebalan Sklera.....	49
	5.5 Pengaruh Injeksi Sel Punca Mesenkimal Limbus pada Ekspresi α -SMA Jaringan Sklera Posterior	50
BAB 6	PEMBAHASAN	53
	6.1 <i>Form Deprivation Myopia</i> pada Hewan Model	54
	6.2 Pengaruh Injeksi SPML Intrasklera pada Ketebalan Sklera pada Sklera Posterior Hewan Model Miopia dengan <i>Form Deprivation</i>	57
	6.3 Pengaruh Injeksi SPML Intrasklera pada Ekspresi α -SMA pada Sklera Posterior Hewan Model Miopia dengan <i>Form Deprivation</i>	63
	6.4 Potensi Penggunaan SPML sebagai Pencegahan Progresivitas Miopia.....	70
	6.5 Keterbatasan Penelitian	73

BAB 7	SIMPULAN DAN SARAN	74
	7.1 Simpulan.....	74
	7.2 Saran.....	74
BAB 8	PENUTUP	76
	DAFTAR PUSTAKA	77
	LAMPIRAN	83

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Perkembangan diameter kolagen fibril pada sklera mamalia	11
Gambar 2.2	Perubahan ketebalan sklera antara mata kontrol dan mata Dengan <i>high myopia</i>	12
Gambar 2.3	Diameter Fibril kolagen sklera pada sklera posterior <i>pigmented rabbits</i> A) model FDM dan B) kelompok kontrol	13
Gambar 2.4	Contoh pewarnaan Hematoxylin Eosin pada sklera	14
Gambar 2.5	Pewarnaan immunohistokimia pada A-C) <i>form-deprived</i> myopia, D-F) kontrol kontralateral, G-I) <i>age-matched</i> normal pada sklera <i>guinea pig</i>	17
Gambar 2.6	Pemeriksaan <i>immunostaining</i> terhadap ekspresi Col2 pada sklera <i>form-deprivation</i> myopia setelah 21 hari mengalami induksi.	18
Gambar 2.7	Sinyal pertumbuhan pada miopia	19
Gambar 2.8	Proses transdiferensiasi <i>myofibroblast</i> sklera terkait dengan patogenesis myopia; A) Penipisan Lapisan koroid dan sklera; B) Proses <i>signaling</i> pada miopia	21
Gambar 2.9	Skematis mekanisme <i>remodeling</i> sklera dan implikasi pada miopia	23
Gambar 2.10	Gambar skematis remodeling pada sklera mata miopia yang menunjukkan peran faktor TGF- β	24
Gambar 2.11	Strategi proses perbaikan Sel Punca Mesenkimal pada target jaringan	25
Gambar 2.12	A) Kontras mikroskopis pada Sel Punca Mesenkimal Limbus menunjukkan morfologi sel <i>spindle</i> ; B)Gambaran sel spindle pada Sel Punca Mesenkimal <i>Bone Marrow Derived</i>	27
Gambar 2.13	Representasi skematik pada pemberian terapi stem cell pada model miopia	30
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian	32
Gambar 4.1	Rancangan penelitian	35
Gambar 4.2	Kerangka operasional	42
Gambar 5.1	Kultur primer sel punca mencapai konfluensi 90% pada hari ke-4 (<i>Inverted Flourescence Microscope</i> , perbesaran 200x)	44
Gambar 5.2	Sel punca mesenkimal limbus pasase (P) 3 menunjukkan hasil positif untuk CD 105, CD 90 , CD 73 dan negatif untuk CD 45. A:DAPI, B :FITC berlabel antibodi, C: gabungan keduanya (<i>Inverted flourescence microscope</i> , perbesaran 200x)	44
Gambar 5.3	(A) Gambaran <i>engravement</i> sel punca mesenkimal limbus pada jaringan posterior sklera kelompok FDM + SPML area temporal nervus optikus; (B) Kelompok Kontrol; (C) Sebaran sel berwarna kuning yang berpendar pada jaringan sklera FDM+SPML (anak panah) (<i>Inverted Flourescence Microscope</i> ,perbesaran 100x)	45
Gambar 5.4	Perubahan status refraksi (pemeriksaan dengan streak retinoskopi) pada sampel penelitian	47

Gambar 5.5	Grafik perubahan panjang <i>axial length</i> sampel penelitian	48
Gambar 5.6	Perbedaan nilai ketebalan sklera pada kelompok sampel penelitian	49
Gambar 5.7	Ketebalan sklera dengan pewarnaan HE pada A) grup kontrol; B) grup model miopia <i>form deprivation</i> ; C) grup model miopia dengan injeksi sel punca	50
Gambar 5.8	Perbedaan nilai intensitas ekspresi α -SMA pada kelompok sampel penelitian	51
Gambar 5.9	Pewarnaan imunohistokimia α -SMA pada sklera A) Jaringan kontrol gastrointestinal; B) grup kontrol dengan intensitas lemah; C) grup model miopia <i>form deprivation</i> dengan intensitas sedang; D) grup model miopia dengan injeksi sel punca. dengan intensitas kuat	52

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Perubahan status refraksi (pemeriksaan dengan streak retinoskopi) pada sampel penelitian	46
Tabel 5.2	Perubahan <i>axial length</i> pada sampel penelitian	48
Tabel 5.3	Nilai ketebalan sklera pada sampel penelitian	49
Tabel 5.4	Nilai median ekspresi α –SMA	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Organisasi Penelitian.....	80
Lampiran 2	Anggaran Penelitian	81
Lampiran 3.	Sertifikat Kelaikan Etik.....	82
Lampiran 4.	Dokumentasi Penelitian.....	83
Lampiran 5.	Data Penelitian dan Analisis Statistik	84
Lampiran 6.	Tabel <i>Immunoreactive Score</i> (IRS).....	101

DAFTAR SINGKATAN

α -SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDM	<i>Form Deprivative Myopia</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HCE	<i>Human Corneal Epithelium</i>
HE	<i>Hematoxylin Eosin</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia Inducible Factor-1 α</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRS	<i>Immunoreactive Score</i>
LIM	<i>Lens Induced Myopia</i>
LMSC	<i>Limbal Mesenchymal Stem Cell</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PSR	<i>Posterior Scleral Reinforcement</i>
SPML	<i>Sel Punca Mesenkimal Limbus</i>

SSPC	<i>Scleral Stem/Progenitor Cell</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase</i>
TNF	<i>Tumor Necrosing Fact</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara global, miopia merupakan penyebab utama dari *visual impairment* dan merupakan salah satu masalah yang penting di bidang mata. Prevalensi dari miopia meningkat tajam dalam beberapa dekade terakhir, menimbulkan kepedulian di bidang kesehatan masyarakat. Saat ini terdapat 153 juta orang pada usia lebih dari 5 tahun yang menderita gangguan penglihatan disebabkan oleh miopia yang tidak terkoreksi dan kelainan refraksi lainnya. Proses inflamasi berperan penting dalam perkembangan miopia. Studi pada hewan model miopia menunjukkan terjadi peningkatan dari sitokin inflamasi IL- 6, TNF- α , c-Fos, dan NF- κ B (Lin *et al*,2016; Pan *et al*,2012; Resnikoff *et al*,2008).

Studi sebelumnya menjelaskan bahwa penyebab utama dari perkembangan miopia adalah akselerasi pertumbuhan lapisan sklera *postnatal*, terutama di bagian posterior sklera. Proses pemanjangan sumbu bola mata tersebut berhubungan dengan *remodeling* struktur matriks ekstraseluler pada sklera (Gentle *et al*,2009).

Sklera merupakan jaringan penting yang berperan dalam akomodasi, karena merupakan dasar yang stabil untuk kontraksi dari otot ekstraokuli. Dengan proses pertahanan terhadap dimensi okuli, sklera penting dalam menentukan ukuran absolut dari bola mata. Saat ini sklera menjadi salah satu target terapi dalam mencegah perkembangan miopia. Penelitian sebelumnya menyebutkan pada miopia terjadi proses peningkatan IL- 6 dan TNF- α , peningkatan ekspresi *matrix-*

1-metalloproteinase (MMP), dan penurunan ekspresi *tissue inhibitor matrix metalloproteinase* (TIMP). Hal ini menyebabkan perubahan seluler dan matriks ekstraseluler dari sklera. Fibroblas pada sklera juga berperan penting dalam komunikasi sel dan matriks ekstraseluler sehingga menjaga keseimbangan dan degradasi dari matriks ekstraseluler dan mempertahankan integritas sklera (Lin *et al*,2016; Gentle *et al*,2009).

Beberapa studi telah dilakukan untuk meneliti terapi dari perkembangan miopia. Ortokeratologi merupakan sebuah metode untuk merubah bentuk lapisan kornea berdasarkan pemakaian *overnight* dari lensa kontak rigid. Studi yang ada menjelaskan bahwa keuntungan dari prosedur ini sangat kecil. Strategi terapi yang lain adalah dengan pembedahan *Posterior Scleral Reinforcement* (PSR) untuk miopia progresif derajat tinggi. Prosedur ini dapat menghambat progress dari miopia namun memiliki banyak komplikasi dan bahan *graft* yang sulit untuk didapatkan. Strategi lainnya yaitu dengan melakukan implantasi sel punca mesenkimal. Penggunaan sel punca mesenkimal awalnya didesain sebagai strategi untuk mengembalikan fungsi dari jaringan yang rusak. Keuntungan dari memasukkan sel punca ke dalam *subsccleral space* adalah kemungkinan untuk menyebabkan keterlibatan sel tersebut dalam retina-sclera *signaling loop*. Sejak injeksi subscclera secara rutin digunakan untuk rute pemberian obat, tanpa menyebabkan perdarahan dan retinal detachment, rute ini juga dapat digunakan untuk proses pemberian sel punca. Sel transplant yang diinjeksi ke dalam sklera diharapkan agar sklera memiliki sel punca mesenkimal didalamnya, yang berdiferensiasi menjadi fibroblas yang memproduksi matriks esktraseluler,

memperkuat sklera dan menghambat pemanjangan bola mata sehingga menghambat perkembangan miopia. Fibroblas terstimulus oleh makrofag, neutrofil, dan sitokin inflamasi yang terlibat dalam proses kompleks, mengarah kepada sekresi dari matrik ekstraseluler dan *remodeling* dari sklera. (Janowski *et al*,2015; Kang& Swarbick,2011; Komaratih *et al*,2019; Ward *et al*,2009).

Oleh karena hal itu, diharapkan pemberian sel punca mesenkimal limbus (SPML) pada hewan model miopia dapat memberikan efek anabolik pada sklera, menurunkan efek penipisan sklera, mencegah pemanjangan sumbu bola mata, sehingga dapat menjadi salah satu terapi pada kasus miopia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang pengaruh pemberian sel punca mesenkimal limbus terhadap penebalan sklera posterior, maka dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terjadi peningkatan produksi α - SMA pada sklera posterior *form deprivation myopia* setelah pemberian SPML melalui injeksi intrasklera?
2. Apakah terjadi peningkatan ketebalan sklera posterior *form deprivation myopia* setelah pemberian SPML melalui injeksi intrasklera?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menjelaskan mekanisme penebalan sklera posterior pada sklera posterior *form deprivation myopia* setelah pemberian injeksi sel punca mesenkimal limbus intrasklera.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan perubahan produksi α -SMA pada sklera posterior hewan model *form deprivation myopia* setelah pemberian SPML melalui injeksi intrasklera.
2. Membuktikan perubahan ketebalan sklera pada sklera posterior hewan model *form deprivation myopia* setelah pemberian SPML melalui injeksi intrasklera.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme regulasi penebalan sklera posterior pada hewan model *form deprivation myopia* setelah pemberian sel punca mesenkimal limbus melalui injeksi intrasklera.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai dasar pengembangan penelitian lebih dalam mengenai penipisan sklera posterior pada miopia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Miopia

Prevalensi miopia meningkat secara drastis dalam beberapa dekade terakhir dan merupakan masalah kesehatan masyarakat secara signifikan. Secara global, terdapat 153 juta orang dengan usia di atas 5 tahun yang memiliki defek penglihatan, dimana 8 juta diantaranya mengalami kebutaan, disebabkan karena miopia yang tidak terkoreksi. Di Asia Timur, angka prevalensi miopia berkisar antara 80 hingga 90 % pada dewasa muda. Prevalensi di Indonesia sendiri adalah 48.1% pada usia lebih dari 21 tahun. Angka progresivitas miopia pada anak-anak di Asia Timur cukup tinggi yaitu -1D setiap tahun dan 24% dari populasi miopia menjadi miopia derajat tinggi saat dewasa (Resnikoff *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2016).

Definisi miopia adalah nilai *spherical equivalent* adalah -0.5 D atau lebih besar. Kriteria standar untuk perhitungan kelainan refraksi adalah refraksi sikloplegik, terutama pada anak-anak. Miopia derajat tinggi didefinisikan jika -6 D atau lebih besar. Miopia juga dapat didefinisikan memiliki *axial length* lebih dari 24 mm dan miopia derajat tinggi jika lebih dari 26 mm (Holden *et al.*, 2016; Morgan *et al.*, 2012).

Miopia disebabkan karena elongasi abnormal dari *vitreous chamber* pada mata. Elongasi bola mata ini terkait oleh proses remodeling dari sklera, hilangnya jaringan sklera dengan penurunan pembentukan jaringan konektif, dan peningkatan degradasi collagen I (COL1) yang menyebabkan perubahan dari

komposisi sklera. Studi yang lain menunjukkan bahwa retina- terutama fotoreseptor dan pigmen epitel retina- memiliki peran penting dalam memodulasi pertumbuhan bola mata dan panjang bola mata, dengan membentuk sinyal aktivasi yang menginisiasi remodeling dari jaringan sklera (Chen *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2016).

Miopia derajat rendah hingga sedang menimbulkan keluhan yang minor seperti ketidaknyamanan saat melihat, dan dapat ditangani dengan kacamata atau lensa kontak. Pada miopia derajat tinggi, resiko komplikasi seperti degenerasi korioritina dan ablasio retina meningkat. Bahkan, 70 % dari miopia lebih dari 6 D memiliki patologi yang mengancam penglihatan (Lin *et al.*, 2016)

2.1.1 Form Deprivation Myopia (FDM)

Perkembangan kondisi refraktif mata tergantung pada *visual image* yang ada. Jika *visual image* dimanipulasi dengan bentuk deprivasi atau dengan lensa, perubahan pada perkembangan mata dan kelainan refraksi akan tampak. FDM adalah salah satu cara atau cara yang lain. Miopia yang terinduksi karena menggunakan *diffuser* memiliki kemiripan dengan miopia yang terinduksi pada manusia disebabkan karena kekeruhan kornea atau keratitis *phlyctenular*. Cara lain adalah dengan menggunakan lensa atau disebut *Lens Induced Myopia* (LIM) dilakukan dengan memberikan lensa minus di depan mata hewan coba untuk mengganggu pembentukan bayangan yang jelas pada retina. FDM berbeda dengan *Lens-Induced Myopia* dimana pada FDM merupakan kondisi *open loop* tanpa titik akhir yang pasti, sedangkan pada LIM merupakan kondisi *closed loop* dimana perkembangan axial menurunkan *hyperopic defocus* yang ditentukan dari lensa,

dan perubahan yang terlalu drastis akan berkurang jika stimulus perkembangan telah dinteralisir. Studi yang ada sebelumnya menjelaskan bahwa pada kedua metode tersebut memiliki kesamaan yaitu dapat menurunkan penurunan *release* dopamin yang mengakibatkan hambatan dari peningkatan elongasi bola mata (Dong *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2014).

Sel amakrin merupakan sumber paling banyak dari dopamin di retina. Dopamin berperan dalam *lens-induced* miopia, tetapi dopamin agonis tidak seefektif pada *defocus-induced* miopia. Contohnya, *form deprivation* menurunkan level dopamin dari retina yang berkaitan dengan perkembangan miopia. Sebuah studi menunjukkan bahwa dopamin agonis dan apomorfin memproduksi efek antimioopia, yang akhirnya dikonfirmasi bahwa merupakan reseptor D2 dependen (Janowski *et al.*, 2015).

Sebuah studi yang dilakukan pada hewan coba *guinea pig* yang mengalami model *form-deprivation* miopia dengan elongasi aksial diikuti oleh miopia dimana mata yang mengalami *form-deprived* menyebabkan ruang vitreus yang lebih panjang, segmen anterior yang semakin dalam, dan penipisan kornea. Hewan *guinea pig* yang diinduksi juga memiliki waktu penyembuhan yang cepat (Wu *et al.*, 2018).

Sebuah studi yang dilakukan oleh Nie *et al* membuat model *form-deprivation* pada model hewan kelinci (*pigmented rabbits*) dan didapatkan 30 hari proses monokuler deprivasi menyebabkan -1.00 dioptri miopia. Terdapat perubahan yang bermakna pada *axial length* bola mata antara kelompok model monokuler deprivasi dan mata kontralateral. Pada studi ini dilakukan pemberian

7-methylxantine pada satu grup untuk mengetahui efeknya terhadap ketebalan sklera posterior, dan didapatkan remodeling dari sklera posterior pada model yang diberikan 7-methylxantine (Nie *et al*, 2012).

Beberapa kondisi harus diperhatikan pada perlakuan FDM. Cahaya terang akan mempengaruhi perkembangan secara protektif FDM pada ayam, *tree shrews*, dan monyet. Secara kontras, cahaya terang menghambat proses *Lens-induced Myopia* pada hewan tersebut. Hal ini masih menjadi perdebatan terkait dari hasil epidemiologi, bahwa anak-anak yang memiliki waktu di luar akan memiliki peluang lebih kecil untuk menjadi miopia, dan efek protektif ini telah dikaitkan dari paparan cahaya terang dan peningkatan dopamin saat berada diluar. Namun selama beberapa dekade terakhir, studi menggunakan hewan pada proses emetropisasi telah rutin menggunakan FDM dengan penutup (*translucent diffusers*) atau dengan penggunaan lensa ukuran negatif (*hyperopic defocus*), dimana keduanya akan mengakibatkan elongasi aksial yang berlebih dan kondisi miopia (Morgan *et al.*, 2013).

2.2 Sklera

Sklera merupakan jaringan terluar dari bola mata yang berfungsi utamanya sebagai proteksi untuk struktur intraokuli didalamnya. Sklera berbentuk rigid, tetapi sedikit fleksibel, relatif kuat dan tidak mudah terpenetrasi, namun memiliki kemampuan untuk membuat akses vaskular dan syaraf ke dalam jaringan intraokuli, dan memiliki kemampuan untuk remodeling secara cepat dan disaat yang sama tetap mempertahankan bentuk dan dimensinya. Fungsi sklera yang lain adalah untuk mempertahankan dimensi aksial yang berguna untuk stabilisasi

gambar di retina. Selain itu fungsi sklera sebagai landasan stabil untuk insersi dari otot ekstraokuli.

Sklera matur merupakan 85% dari total permukaan okuli. Terdapat transisi gradual antara kornea dan sklera pada limbus. Transisi tersebut tertutup oleh episklera yang merupakan suatu jaringan ikat longgar. Pada manusia, sklera secara bertahap menebal dari regio anterior menuju posterior dan mencapai ketebalan maksimum 1 mm pada pole posterior. Sklera menipis pada bagian insersi tendon otot rektus dan membentuk *scleral spur* dan internal scleral sulcus sebagai sudut drainase anterior. Sklera di bagian posterior bergabung dengan jaringan dura dari syaraf optik yang keluar dari bola mata (Gentle *et al*,2009).

2.2.1 Perkembangan struktur sklera

Perkembangan dari sklera manusia telah dimulai saat gestasi 6.5 minggu dan terbentuk dari anterior-posterior yang berawal dari sel mesenkimal *neural crest*. Fibril kolagen mulai muncul di sklera posterior saat minggu ke-7 dan di regio anterior, ukuran diameter kecil dan distribusi sempit. Saat gestasi, fibril kolagen diameter meningkat secara stabil. Pada minggu ke-7 sel anterior mulai menampilkan karakter flat dari fibroblas sklera. Pada bulan ke-6 tampak mitosis dari fibroblas sklera, menunjukkan bahwa diferensiasi sel telah sempurna. Dalam proses perkembangannya, deposisi dari elastin dan proteoglikan mengikuti peningkatan diameter dari fibril kolagen.

Perkembangan *postnatal* dari sklera terus berlanjut menunjukkan karakter perkembangan aksis anterior-posterior, seperti pada sklera embrional. Hal ini

ditunjukkan dari temuan sintesis kolagen merupakan paling aktif di segmen posterior mata. (Gentle *et al*, 2009)

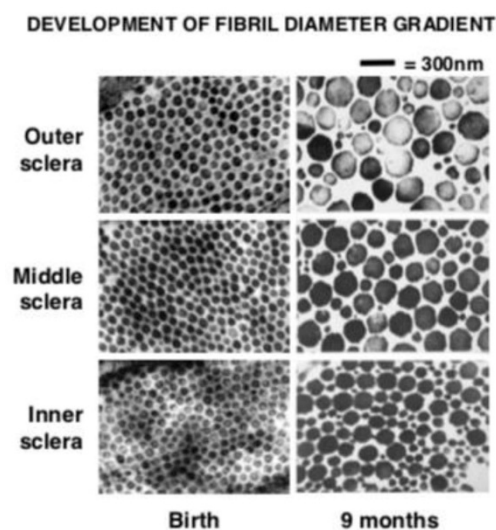
2.2.2 Struktur sklera

Sejak lama, struktur sklera telah dikenal mirip dengan struktur dari stroma kornea yang mana merupakan bagian yang berkelanjutan, teratur, dan terspesialisasi secara regional, sehingga meningkatkan kemampuan sklera.

Penelitian terakhir menjelaskan bahwa terdapat gradien anterior-posterior pada pertumbuhan konsentrasi *scleral fibroblast growth factor-2* (FGF-2) dimana FGF-2 merupakan inhibitor poten dari produksi kolagen. Hal ini memberikan hasil yang sesuai dengan peran FGF-2 sebagai kontrol pertumbuhan aksis anterior-posterior melalui pengaruh produksi kolagen tipe I.

Penelitian terbaru menunjukkan pengertian yang lebih jelas mengenai karakter dan perkembangan sklera normal dan mekanisme yang terjadi pada miopia axial. Model hewan yang telah digunakan pada beberapa studi adalah *tree shrew* model, dimana model ini telah memberikan hasil yang substansial pada perkembangan *postnatal* dari sklera normal. Meskipun *tree shrew* muda terlahir dengan mata tertutup, hasil ini sesuai dengan temuan lain pada mamalia yang menjelaskan bahwa di akhir usia gestasi, diameter fibril kolagen sklera relatif kecil (*median value* 62 nm). Dengan bertambahnya usia, diameter fibril menjadi condong secara positif disebabkan diameter kolagen yang tampak lebih besar dan telah mencapai ukuran dewasa pada usia 4-6 bulan. Diameter fibril kolagen sklera pada manusia dewasa bervariasi dari 28 hingga 280 nm, dimana hasil tersebut mirip dengan hasil pada mamalia, termasuk model *tree shrew*. Pada

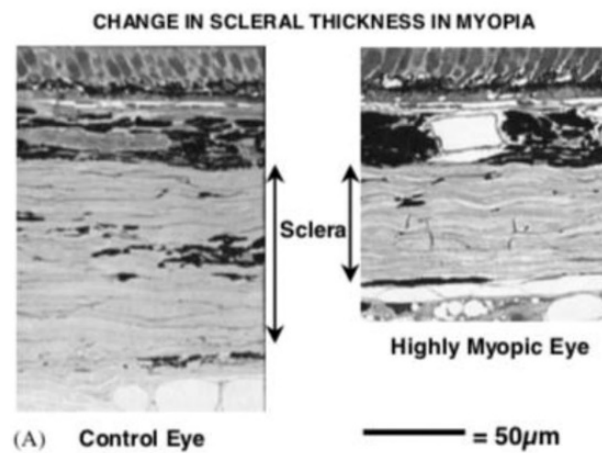
perkembangan *postnatal*, gradien trans-sklera pada diameter fibril, dimana merupakan minimal pada saat lahir (ukuran serabut dalam 59 nm, serabut tengah 62 nm, dan serabut luar 64 nm), dan menjadi teraksentuasi dengan diameter fibril yang lebih besar di luar. Distribusi profil dari diameter kolagen fibril mendemonstrasikan peningkatan gradien pada diameter median melewati ketebalan sklera, dimana jumlah yang lebih besar dari serabut kecil di sklera bagian dalam, dan jumlah yang meningkat dari serabut besar di sklera bagian luar (Gentle *et al.*,2009).



Gambar 2.1 Perkembangan diameter kolagen fibril pada sklera mamalia (Gentle *et al.*,2009)

Fenomena dari gradien serabut trans-sklera dapat ditemukan di spesies mamalia lain termasuk manusia, yang mana hal ini merupakan representasi dari fungsi spesialisasi. Hal ini diduga terjadi sebagai respon dari stress diferensiasi sirkumferensial sklera. Hal ini didukung oleh fakta bahwa variasi stress yang terjadi pada jaringan ikat dapat mempengaruhi perubahan pada diameter kolagen. Fibril kolagen terorganisasi menjadi serabut yang pada manusia berada di

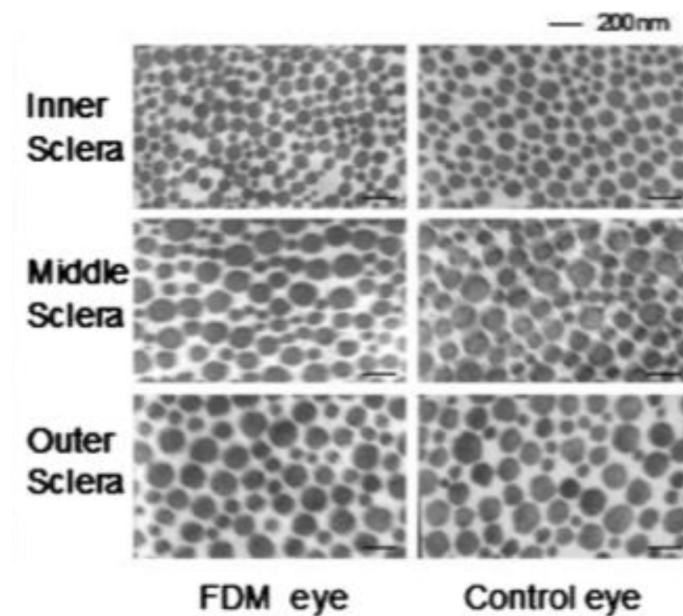
ketebalan antara 10 dan 16 μm dan luas 100 dan 140 μm . Meskipun diameter fibril kolagen memiliki kemiripan antara mamalia kecil dan besar, namun struktur serabut kolagen secara *cross-sectional* lebih tipis dan sempit pada mamalia kecil. Hal ini menandakan bahwa organisasi serabut merupakan faktor kritis yang menentukan properti dari lapisan terluar pada ukuran mata yang berbeda-beda.



Gambar 2.2 Perubahan ketebalan sklera antara mata kontrol dan mata dengan *high myopia* (Gentle *et al.*, 2009)

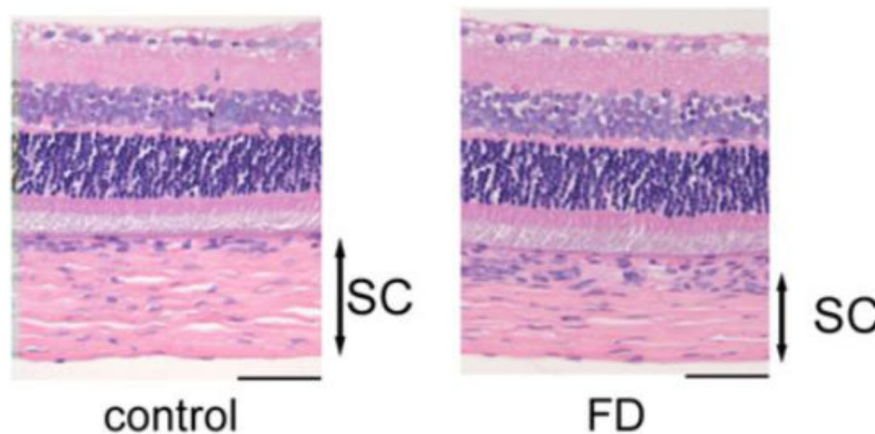
Pada *tree shrew*, ketebalan sklera terdehidrasi dekat dengan ukuran dewasa setelah sekitar 45 hari ($\sim 80\mu\text{m}$). Menariknya, pada usia tersebut baik pertumbuhan aksial dan produksi kolagen tipe I pada *tree shrew* muda telah menurun, dengan 90% telah sesuai dengan ukuran mata dewasa. Pengaturan dari proses molekular yang mendasari perkembangan dari sklera terprogram sedemikian rupa sehingga resistansi sklera menjadi maksimal setelah mata mencapai ukuran dewasa dan tidak berlanjut untuk berkembang lagi. Observasi ini menunjukkan bahwa perubahan aberan yang terjadi pada pertumbuhan mata lebih terjadi pada posterior *pole* dari mata dan lebih mudah terjadi pada hewan yang lebih muda (Gentle *et al.*, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Nei *et al* menggunakan potongan dari sklera posterior kelinci, dilakukan pewarnaan, dan pemeriksaan dengan mikroskop elektron pada fibril kolagen di potongan transversal dari sisi terluar, tengah, dan dalam dengan magnifikasi 2100. Dari pemeriksaan tersebut didapatkan 400 fibril pada tiap sampel lapisan sklera.



Gambar 2.3 Diameter fibril kolagen sklera pada sklera posterior *pigmented rabbits* A) model FDM dan B) kelompok kontrol (Nei *et al*,2012)

Dari hasil studi tersebut didapatkan bahwa diameter fibril kolagen meningkat dari sklera bagian dalam ke bagian terluar. Setelah perlakuan deprivasi selama 30 hari, didapatkan penurunan diameter sklera dibanding kelompok kontrol (Gambar 2.3) (Nei *et al*,2012).



Gambar 2.4 Contoh pewarnaan Hematoxylin Eosin pada sklera. Pada perbandingan didapatkan perubahan ketebalan sklera antara kontrol dan contoh *Form Deprivation*; SC=Sclera. (Shinohara *et al*,2017)

Pada studi yang dilakukan oleh Shinohara *et al.* (2017) didapatkan perubahan pada sklera mata contoh model hewan tikus albino wistar setelah 4 minggu dilakukan form deprivasi menggunakan penjahitan kelopak mata dengan benang nylon 6.0. Pengukuran ketebalan sklera kemudian menggunakan fiksasi dari jaringan sklera pada mata yang telah dilakukan enukleasi. Fiksasi menggunakan 10% *phospate-buffered formalin* dan kemudian direndam dalam parafin. 8 μ m dipotong sesuai axis vertikal dan dilakukan pewarnaan dengan haematoxylin dan eosin. Kemudian preparat dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop. Ketebalan sklera diukur 1 mm dari nasal dan temporal ke diskus optik.

2.2.3 Kolagen

Sklera merupakan jaringan ikat yang sebagian besar terdiri dari kolagen. Pada mamalia, kolagen membentuk sebanyak 90% dari berat sklera dan sebagian dari kolagen ini merupakan tipe I. Namun, sejumlah kecil dari tipe III dan V

kolagen juga didapatkan dari sklera mamalia. Hal ini menandakan bahwa serabut kolagen fibril sangat heterogen, yang mana merupakan hal yang dapat terjadi pada jaringan ikat di tempat lain. Kolagen tipe V ditemukan penting dalam regulasi diameter diameter fibril saat proses pembentukan fibrin, yang dibuktikan dengan konsentrasi kolagen tipe V yang tinggi pada kornea untuk menghasilkan diameter serabut kolagen yang uniform (McBrien & Gentle, 2009).

2.2.4 α SMA

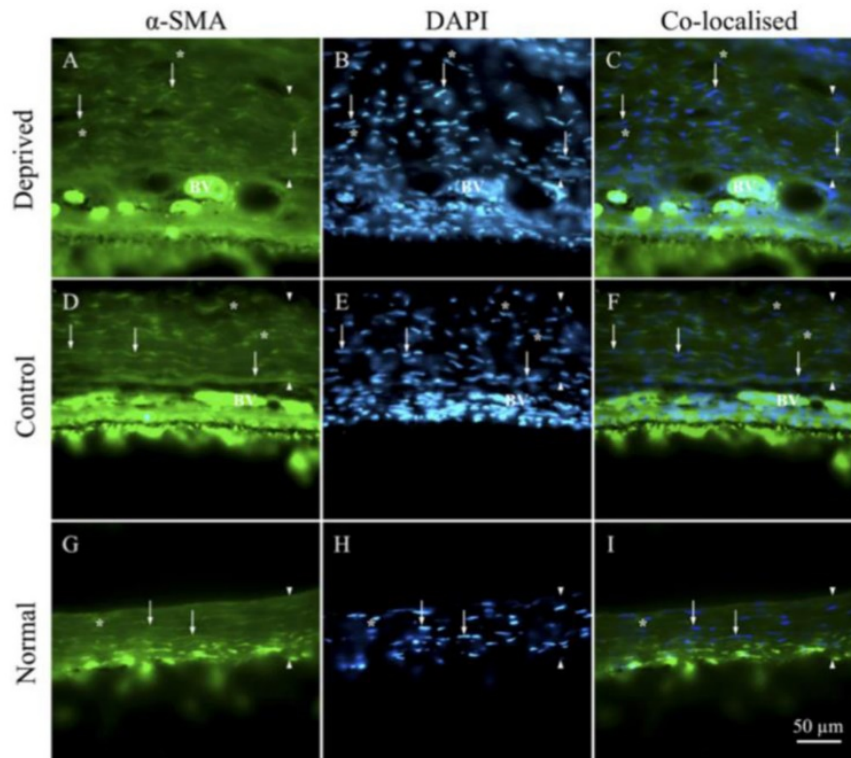
Studi sebelumnya menunjukkan bahwa sel sklera mengekspresikan α -smooth muscle actin (α -SMA), suatu cytoskeletal protein yang dikarakterisasi dengan *myofibroblast* kontraktil. *Myofibroblast* merupakan sel yang mengekspresikan jenis protein *cytoskeleton*, terutama α -SMA, yang memberikan efek kontraktil. Kemampuan kontraktilitas ini membuat myofibroblas penting dalam perbaikan matriks ekstraselular dan penyembuhan luka. α -SMA merupakan protein penanda utama pada *myofibroblast* dan memiliki peran penting dalam kontraktilitas fibroblas. Setelah mendapat paparan stress, sel ini dapat secara cepat berkontraksi untuk menghambat ekspansi dari matriks sekitar.

Ekspresi α -SMA dapat meningkatkan aktivitas kontraktil fibroblas. Proporsi *myofibroblast* pada sklera diduga meningkat dengan bertambahnya umur dan mengalami diferensiasi dengan fibroblas sklera. Stress yang didapatkan oleh sel sklera secara in vivo dapat mengambil alih efek dari TGF-B pada fenotipe sel, memberi kesan bahwa peningkatan ekspresi α -SMA saat miopia merupakan respons dari sel dikarenakan jaringan yang melemah. Pada mata dengan perkembangan miopia, α -SMA mengalami peningkatan yang mana terdapat

peningkatan dari kontraktilitas *myofibroblast*, dan penurunan pada yang mengalami penyembuhan dari miopia.

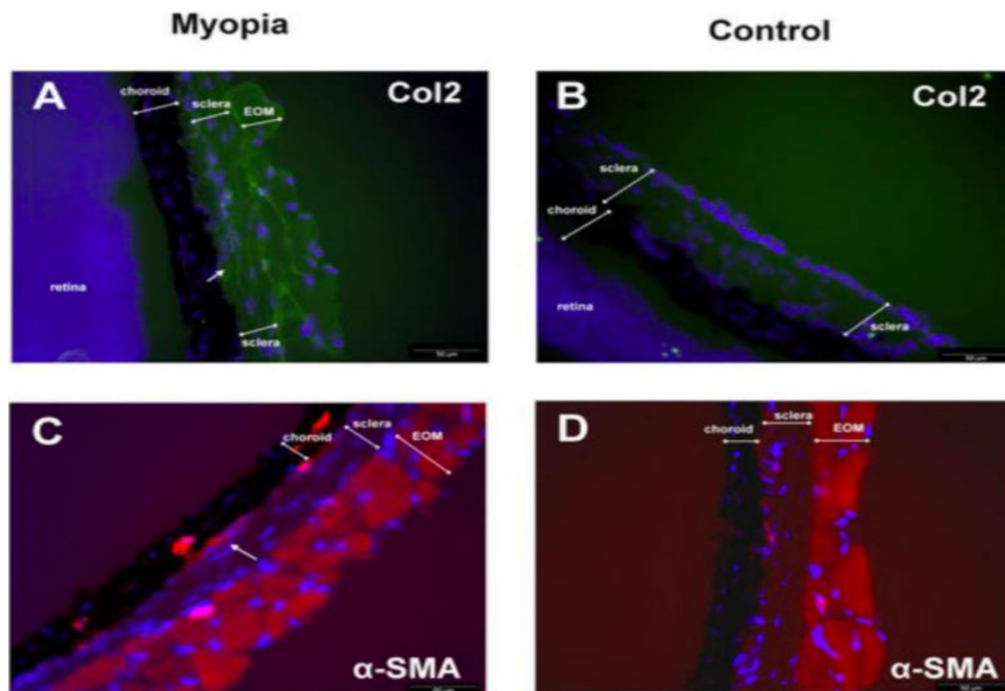
Dari studi yang dilakukan oleh Jobling *et al*, TGF-B merubah fenotipe sel sklera untuk memproduksi kontraktil tingkat tinggi, α -SMA-expressing *myofibroblast* (TGF-B3 > TGF-B2 > TGF-B1). Namun demikian, stress pada sklera yang merupakan faktor paling mendominasi dalam melawan efek TGF-B, termasuk meningkatkan ekspresi α -SMA dan membuat populasi sel kontraktil lebih besar pada sel myopic. (Jobling *et al*,2009; Liu & Wang,2017)

Myofibroblast terdapat di sklera manusia, kera, dan *tree shrew*. Sebuah studi yang dilakukan oleh Backhouse & Phillips membuktikan bahwa miofibroblas juga terdapat di *guinea pig*. Studi tersebut membagi tiga grup penelitian yaitu model *form-deprived*, kontrol kontralateral, dan normal. Dari hasil studi didapatkan tidak ada perbedaan signifikan dari hasil pemeriksaan jumlah sel miofibroblas pada sklera tiga grup tersebut. Sklera diambil dengan tinggi 3 mm dengan posisi *centered* pada *Optic Nerve Head* dan memanjang dari nasal hingga ke ora serrata bagian temporal. Pada mata miopia, terdapat penurunan aliran darah pada daerah *myopic crescent*, dan hal ini memungkinkan berperan dalam penurunan jumlah sel. Jumlah *myofibroblast* yang terdapat pada sklera dapat dikorelasikan dengan respons biomekanis dari jaringan yang disebabkan dari potensi kontraktil sel tersebut. Dari studi ini menjelaskan bahwa perubahan pada komposisi sklera, adhesi dari miofibroblas fokal, atau ekspresi α -SMA memiliki kemungkinan lebih besar untuk berperan pada perubahan respon antara mata *form-deprived* dan kontrol, dibanding dengan jumlah sel (Backhouse & Phillips, 2010).



Gambar 2.5 Pewarnaan immunohistokimia pada A-C) *fom-deprived* miopia, D-F) kontrol kontralateral, G-I) *age-matched* normal pada sklera *guinea pig*. Dilakukan *double-labeling* dengan DAPI untuk semua nuclei sel (B,E,H), dan dengan α -SMA pada *myofibroblast stress fibers* (A,D,G), dan *co-localization* pada DAPI dan α -SMA juga dilakukan (C,F,I) (Backhouse & Phillips, 2010)

Myofibroblast seperti fibroblas, berperan sebagai *turnover* normal pada kolagen, yang kemudian menghambat ekspansi dari jaringan dengan mendegradasi matrix dengan *matrix metalloproteinase*, hal ini menunjukkan bahwa sklera berperan sebagai scaffolding, mengambil fungsi dari kolagen hingga matrix yang baru tersintesa. Penurunan kontraktilitas dari *myofibroblast* mengakibatkan ketidakmampuan untuk mempertahankan posisi matriks, sehingga terdapat ekspansi dalam ukuran kecil yang secara bertahap akan menghasilkan elongasi aksial. Proses ini dapat berperan penting dalam proses remodelling aktif pada *developing* miopia (Backhouse dan Phillips, 2010).



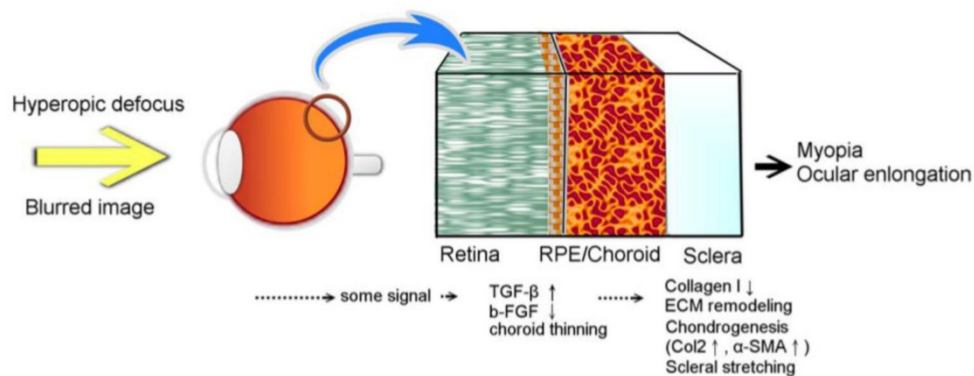
Gambar 2.6 Pemeriksaan *immunostaining* terhadap ekspresi Col2 pada sklera *form-deprivation myopia* setelah 21 hari mengalami induksi. Col2 tereksresi lebih banyak pada model miopia(A) dibanding kontrol (B). α -SMA memiliki ekspresi lebih besar pada daerah sklera dan koroid yang mengalami miopia (C) dibanding kontrol (D) (Backhouse & Phillips, 2010).

2.3 Sinyal Pertumbuhan pada Miopia

Beberapa molekul telah dianggap sebagai faktor dalam perkembangan miopia. Pada mata miopia, ekspresi TGF- β dan *matrix metalloproteinase* (MMP) 2 meningkat, dimana ekspresi COL1 menurun. TGF- β meregulasi fungsi seluler seperti perkembangan sel, diferensiasi, inflamasi, dan perbaikan luka, sementara MMP berperan dalam pemecahan matriks ekstraseluler dan rekonstruksi jaringan. Disregulasi dari MMP juga berperan dalam mekanisme patogenesis mata miopia. Ekspresi MMP2 ditingkatkan pada sklera *tree shrews* yang diberikan *form-deprivation myopia*. TGF-B mengatur level dari MMP2 lewat aktivasi dari

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), faktor transkripsi yang memodulasi berbagai ekspresi dari sitokin inflamasi pada fibroblas (Lin *et al.*, 2016).

Pada miopia, terjadi modifikasi jaringan yang dihasilkan dari proses inflamasi. Respon inflamasi menarik sitokin, prostaglandin, sel darah, dan faktor pertumbuhan ke arah tempat radang dan juga mengarahkan pembuluh darah ke area ini. Sehingga, dari proses ini didapatkan dugaan bahwa proses inflamasi berperan dalam perkembangan miopia (Lin *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 Sinyal pertumbuhan pada miopia (Wu *et al.*, 2015)

Sinyal yang dimediasi oleh TGF- β dan TNF- α mempengaruhi secara dominan proses aktivasi NF- κ B, faktor transkripsi yang penting dalam mediasi inflamasi. Pada jalur ini, sinyal dari mediator pro-inflamasi mengarahkan pada aktivasi I κ B kinase α/β dan I κ B kinase α/β , NF- κ B, yang mengarahkan produksi dari berbagai sitokin pro-inflamasi, termasuk TNF- α dan IL-6. Faktor transkripsi yang penting dalam sitokin pro-inflamasi adalah *activator protein 1* (AP1), aktivasi yang dimediasi dari fosforilasi dan *mitogen-associated protein* (MAPKs) (Lin *et al.*, 2016).

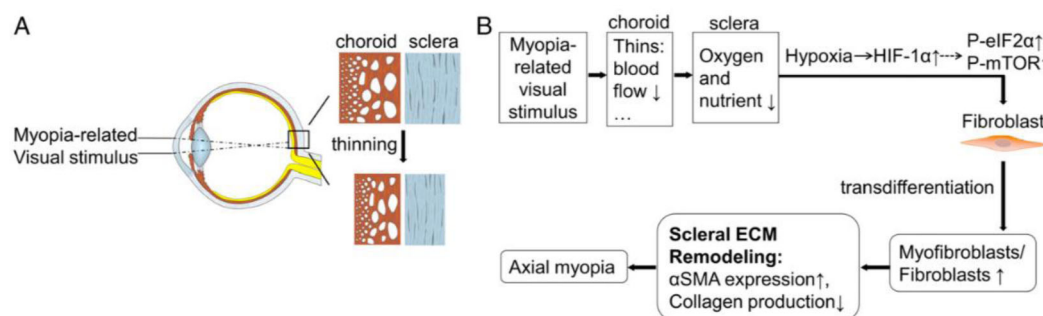
Perubahan molekuler pada kondisi miopia berupa penurunan konten kolagen sklera yang menyebabkan pengurangan diameter fibril kolagen, penurunan glikosaminoglikan, peningkatan MMP-2 dan penurunan TIMP-1, *downregulation* dari TGF- β dan *upregulation* dari FGF- β . Namun perubahan molekuler ini bersifat *reversible*, dimana jika eksperimen *inducing-myopia* diterminasi, maka level ekspresi dari molekul ini akan kembali ke nilai *baseline* awal. Penurunan rasio kolagen sub tipe V/I dianggap merupakan salah satu faktor penting pada alterasi diameter fibril pada miopia (Metlapally & Wildsoet, 2016).

2.4 Perubahan Sklera pada Miopia

Pada perkembangan miopia, properti mekanis sklera akan berubah. Sklera mamalia terdiri dari 90% kolagen tipe I. Kolagen tipe I memiliki kekuatan yang besar. Ekspresi kolagen I menurun pada sklera miopia. Elastisitas dari sklera pada mata miopia menunjukkan peningkatan pada elastisitas sklera (*creep rate*) pada awal perkembangan miopia. Studi yang dilakukan oleh Wu *et al* menunjukkan ada peningkatan dari Col2 pada mata tikus miopia. Hal ini menjelaskan bahwa pada miopia terjadi penurunan dari kolagen tipe I atau penggantian oleh peningkatan Col2, dan kekakuan sklera miopia akan menurun, dan elastisitas akan meningkat. Mata miopia akan kemudian lebih mudah terjadi elongasi dan peningkatan dari panjang sumbu mata axial.

Kondrogenesis juga mungkin terjadi pada mekanisme miopia. Col2 telah diidentifikasi berada pada sklera embrionik tikus dan serabut kolagen besar pada sklera avian. Meskipun hanya sedikit Col2 yang diidentifikasi pada sklera manusia, terdapat studi yang menunjukkan bahwa Col2 berperan penting pada

perkembangan miopia pada manusia, seperti pada sindroma Stickler tipe II yang mana merupakan penyakit mutasi gen *Col2A1* (Wu *et al.*, 2012).



Gambar 2.8 Proses transdiferensiasi miofibroblas sklera terkait dengan patogenesis miopia; A) Penipisan Lapisan koroid dan sklera; B) Proses *signaling* pada miopia (Wu *et al.*, 2018)

TGF- β berperan penting dalam perkembangan miopia. Beberapa studi genetik menunjukkan bahwa gen TGF- β terkait dengan miopia. Pada model tikus dengan sindroma Marfan dengan *enhancement* TGF- β , pemberian antibodi anti TGF- β memberikan penurunan sumbu axial yang signifikan. TGF- β memiliki efek antagonis pada perkembangan fibroblast growth factor-2 (FGF-2). FGF-2 mengurangi miopia dan TGF- β menghambat efek FGF pada miopia. Pada studi yang dilakukan oleh Wu *et al*, ekspresi oleh TGF- β ditemukan pada RPE-choroid complex pada mata *Form Deprivation Myopia* (Wu *et al*, 2012).

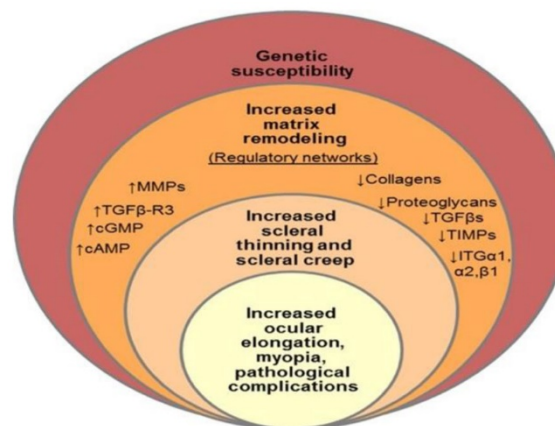
Studi lain menjelaskan bahwa hipoksia merupakan modulator kunci pada *remodeling* matriks ekstraseluler sklera pada model miopia. Hal ini terkait dengan sintesis yang menurun dan peningkatan degradasi pada komponen matriks ekstraseluler, yang membuat penurunan *framework* sklera dan meningkatkan elongasi dari okuli. Sebagai contoh, kolagen tipe I merupakan komponen terbesar dari matriks ekstraseluler sklera, dan penurunan ekspresi akan melemahkan

struktural dari sklera. Saat perkembangan miopia, *turnover* dari kolagen tipe I meningkat disebabkan dari *down-regulation* dari sintesisnya bersamaan dengan peningkatan degradasi. Studi ini menjelaskan adanya peningkatan HIF-1 α yang merupakan marker hipoksia pada mata dengan model *form-deprived* dan peningkatan elongasi aksial didapatkan setelah dua minggu dilakukan *form-deprivation*. Selain itu didapatkan peningkatan sel Myofib-L dan α -SMA pada sklera saat perkembangan miopia. Remodeling dari sklera disebabkan karena peningkatan transdiferensiasi pada miofibroblas dan terkait dengan penurunan gen *colla1* dan *colla2*. Proteinase degradatif melakukan *up-regulation* dan menyebabkan peningkatan pada *turnover* kolagen (Wu *et al*,2018).

Perubahan *myofibroblast* pada perkembangan miopia berbeda pada perubahan yang terjadi pada proses penyembuhan luka. Pada proses penyembuhan luka, *myofibroblast* mengekspresikan fenotipe profibrotik dengan *up-regulation* dari komponen matriks ekstraseluler seperti fibronectin dan kolagen, sedangkan pada perkembangan miopia, transdiferensiasi miofibroblas mengekspresikan penurunan *Colla1*. Selain itu, peningkatan α -SMA yang terjadi pada model *form-deprived* paling banyak terjadi di lapisan sklera dekat koroid, menjelaskan bahwa terdapat peran koroid pada transdiferensiasi fibroblas sklera (Wu *et al*,2018).

Pada mata dengan kondisi miopia, didapatkan penipisan pada sklera. Perubahan sklera dipengaruhi oleh perubahan konten kolagen sklera, penipisan fibril kolagen, dan penurunan dari jumlah sulfat dan non-sulfat pada sklera. Pada studi yang dilakukan pada Jobling *et al*. didapatkan hasil bahwa pada mata dengan proses miopia yang berkurang, didapatkan dua jalur regulasi α -SMA saling

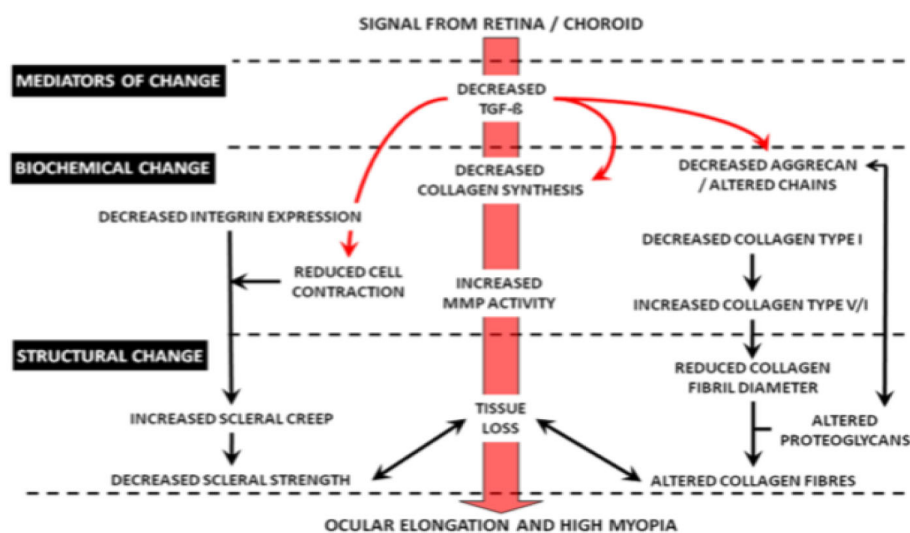
berlawanan (TGF- β dan *matrix stress*). Hal ini menyebabkan perubahan ekspresi pada α -SMA dengan variasi yang berbeda. TGF- β berperan sebagai regulator positif pada in vitro namun tidak pada in vivo (Jobling *et al*, 2009).



Gambar 2.9 Skematis mekanisme remodeling sklera dan implikasi pada miopia (Metlapally & Wildsoet, 2016)

Pada studi yang dilakukan oleh McBrien, didapatkan bahwa TGF- β merupakan stimulator poten untuk ekspresi gen α -SMA dan miofibroblas di sklera, dimana hasil tersebut mirip dengan sistem jaringan kolagen yang lain. Penurunan level dari TGF- β yang ditemukan pada sklera kondisi miopia menyebabkan penurunan signifikan pada kontraksi matriks dari ketebalan densitas miofibroblas (gen ekspresi α -SMA). Dua sinyal penting yang mengontrol perubahan fibroblas menjadi *myofibroblast* pada sklera adalah paparan stress pada sel sklera dan matriks ekstraselular dan sitokin TGF- β . Dua faktor ini berperan kompetitif. Saat sklera menipis pada miopia hal ini menyebabkan peningkatan stress pada sel sklera dan sel matriks ekstraselular yang akhirnya menyebabkan peningkatan fibroblas menjadi miofibroblas. Namun, pada awal perkembangan miopia terdapat penurunan isoform TGF- β pada sklera dimana mengarah pada

penurunan diferensiasi miofibroblas. Sehingga kedua faktor ini, dimana sinyal TGF- β dan stress pada matriks akan menyebabkan efek kompetisi pada ketebalan miofibroblas pada sklera dari mata miopia. Pada studi yang dilakukan didapat hasil bahwa faktor stress pada matriks membalik penurunan densitas miofibroblas dan meningkatkan ekspresi gen α -SMA. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua faktor tersebut akan menghasilkan jumlah densitas miofibroblas yang konstan. Pada eksperimen *in vivo*, kedua jalur ini memediasi ekspresi α -SMA baik pada melawan (kondisi miopia) atau sinkronisasi (proses *recovery*) (McBrien, 2013).



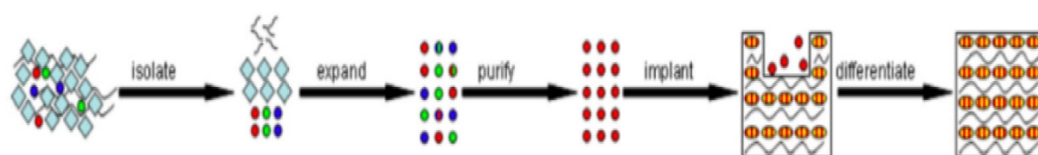
Gambar 2.10 Gambar skematis *remodeling* pada sklera mata miopia yang menunjukkan peran faktor TGF- β (McBrien,2013).

2.5 Sel Punca Mesenkimal

Sel punca mesenkimal merupakan sel punca dewasa yang dapat berasal dari manusia dan hewan. Sel punca mesenkimal manusia merupakan non-hematopoetik, multipoten dengan kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi mesoderm (osteosit, adiposit, kondrosi), ektoderm (neurosit), dan endoderm

(hepatosit). Sel punca mesenkimal mengekspresikan penanda permukaan sel seperti diferensiasi CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 dan kurangnya ekspresi dari CD14, CD34, CD45 dan HLA-DR. Sel punca mesenkimal memiliki kemampuan imunomodulator, mensekresi sitokin dan imun reseptor yang meregulasi *microenvironment* pada jaringan *host* (Ullah *et al.*, 2015).

Sel punca mesenkimal sendiri memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi secara *in vitro* menjadi tiga jaringan mesenkimal, yaitu tulang, kartilago, dan lemak. Sel punca mesenkimal memiliki populasi sel yang heterogen dengan beberapa jenis variasi potensi dan hal ini juga berlaku untuk sel punca mesenkimal dari sumsum tulang. Beberapa studi lain juga menjelaskan bahwa sel punca mesenkimal dapat berdiferensiasi menjadi *skeletal myocyte* dan *tenocyte* (Augello *et al.*, 2010).



Gambar 2.11 Strategi proses perbaikan Sel Punca Mesenkimal pada target jaringan. Sel punca dilakukan ekspansi secara *in vitro* setelah isolasi, kemudian dilakukan *enrichment* berdasar *marker* spesifik untuk fenotip sel punca yang mengarah pada diferensiasi pada sel matur yang diperlukan (Augello *et al.*, 2010)

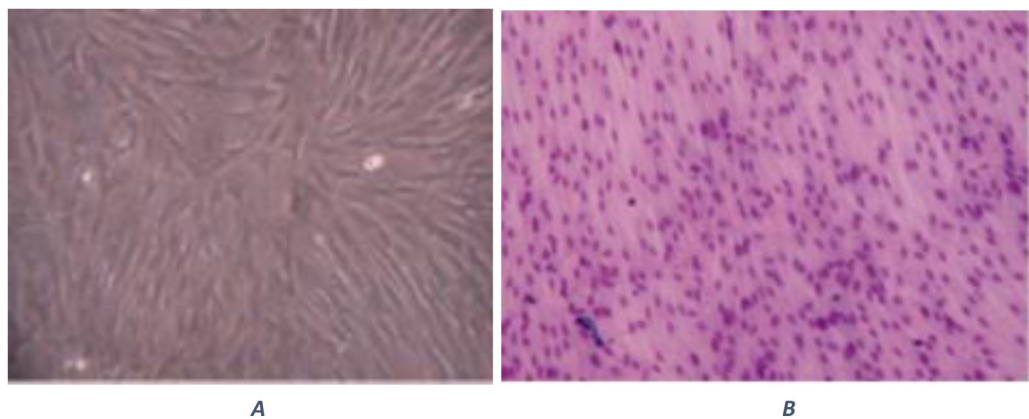
Menurut *International Society for Cell Therapy*, terdapat kriteria minimal untuk identifikasi sel punca mesenkimal, yaitu: kemampuan untuk berada pada kondisi kultur standar, memiliki salah satu fenotip CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-, HLA-DR-, CD14- or CD11b-, CD79a- atau CD19- yang telah dianalisis, memiliki diferensiasi secara *in vitro* menjadi osteoblast, adiposit, dan *chondroblast* (yang didemonstrasikan dengan pewarnaan secara *in vitro* pada

kultur sel). Kriteria ini tidak berlaku untuk antar spesies. Pada contoh model hewan tikus, diferensiasi sel punca berbeda dengan manusia dimana memiliki *marker* ekspresi yang berbeda. Dari studi yang pernah dilakukan, sel turunan dari berbagai macam jaringan menunjukkan fenotip yang heterogen dan berbeda pada kemampuan untuk berkembang, namun mereka juga menunjukkan kesamaan yaitu memiliki potensi untuk berdiferensiasi menjadi *lineage* mesenkimal. Dengan sumber jaringan yang berbeda, populasi sel punca mesenkimal *single-cell-derived* cenderung heterogen pada proses proliferasi dan diferensiasi potensi. Pada beberapa jaringan yang memiliki kondisi patologis maka bisa didapatkan presentasi yang berbeda, semisal pada pasien dengan kondisi rematoid arthritis, maka sel punca mesenkimal akan tampak seperti reseptor protein morfogenetik, atau pada darah perifer pasien dengan luka bakar akut, maka didapatkan peningkatan sel yang diduga sel punca mesenkimal pada sirkulasi darah (Augello *et al*, 2010)

2.5.1 Sel Punca Mesenkimal Limbus

Sel punca mesenkimal telah sukses digunakan di beberapa aplikasi klinis yang menargetkan regenerasi/ rekonstruksi dari jaringan ikat, dan properti dari sel punca mesenkimal yang mendukung dalam *reinforcement* dari sklera. Secara teknis, transplantasi dari sel punca mesenkimal autologous termasuk prosedur mudah dan aman, yang dapat diaplikasikan pada anak-anak dengan miopia untuk mengurangi perkembangan dari penyakit. Strategi ini termasuk pengambilan sel punca mesenkimal dari tulang belakang, lemak, atau jaringan lain, dilakukan kultur hingga karakter sel yang cocok didapatkan, dan kemudian transplantasikan menggunakan microneedle ke subsklera (Janowski *et al*, 2015).

Sel punca mesenkimal limbus didapat dari jaringan limbus *fresh*. Dari sebuah studi didapatkan proses pengambilan jaringan limbus dari subjek manusia untuk rekonstruksi permukaan okuli dan membandingkan dengan kultur dari sel punca mesenkimal *bone marrow*. Kultur sel punca mesenkimal sendiri didapat dari sumsum tulang belakang manusia menggunakan medium khusus. Studi tersebut membuktikan bahwa sel punca mesenkimal limbus yang didapat familiar dengan sel punca mesenkimal *bone marrow* (Polisetty *et al.*, 2008)



Gambar 2.12 A) Kontras mikroskopis pada Sel Punca Mesenkimal Limbus menunjukkan morfologi sel *spindle*; B) Gambaran sel *spindle* pada Sel Punca Mesenkimal *Bone Marrow Derived* (Polisetty *et al.*, 2008).

Secara morfologis, Sel punca mesenkimal limbus sendiri secara relatif kecil dan memiliki ukuran 10.1 μm pada diameter, dan secara struktural memiliki granulitas sel yang rendah dan berpigmen. Di sisi lain, sel ini memiliki khas berbentuk *spindle* dan terelongasi. Sel ini terbukti mengekspresikan α -*enolase*, *vimentin*, *cytokeratin 3*, *cytokeratin 14*, and *p63 α* , suatu faktor transkripsi (Polisetty *et al.*, 2008).

Proses kultur sel punca mesenkimal limbus dimulai dengan mendapatkan jaringan limbus dari biopsi. Biopsi dilakukan dengan proses diseksi jaringan

limbus dengan ukuran $1 \times 2 \text{ mm}^2$ dari epitel limbus dengan kedalaman 0,5 mm, 3 mm dari posterior limbus memanjang ke anterior. Jaringan limbus kemudian direndam media transport dengan *human corneal epithelium* (HCE). Ketika monolayer dari sel kultur sudah terbentuk setelah dilakukan eksplant selama 10-14 hari, maka diberikan plat paralel untuk dikembangkan selama dua hingga tiga minggu berikutnya ketika pertumbuhan sel *spindle-like* dapat dilihat dengan mikroskop kontras. Setelahnya kemudian dilakukan tripsinisasi dan diletakkan pada plat. Setelah dua hari plating, maka tampak *adherent spindle cells* yang disebut dengan sel punca limbal mesenkimal. Sel ini akan dikultu pada HCE dengan 10 % *fetal bovine serum* (FBS) dimana ketika konfluensi sel mencapai 80 %-90%, kultur dapat dikembangkan dengan Trypsin 0,25%. Kultur sel membutuhkan kondisi khusus seperti kelembaban 5 % CO_2 dengan suhu inkubator 37°C . Sel bisa diterminasi dan dipisah untuk dikultur kembali. Pada umumnya membutuhkan waktu sekitar 10-14 hari. Dibawah mikroskop dengan pembesaran 200 kali akan terlihat *spindle cell like*, mirip fibroblast, memanjang, dengan 1 inti. Sel kultur bisa dipanen dengan 0,25 % trypsin dan 1 mM EDTA dari pasase P0 sampai P6 (Polisetty *et al*, 2008).

Karakterisasi SPML bisa dilakukan dengan *flow cytometry*. Pada *flow cytometry* SPML limbus memiliki ekspresi positif terhadap marker mesenkimal CD90, CD105, CD29, CD56, CD73 CD13, epithelial (K13, K14), hematopoiesis (CD11B, CD 34, CD133,). Dalam proses *flow cytometry*, satu suspensi sel ($0,5-1 \times 10^6$) sel SPML pada pasase dengan media buffer (100 μl *phosphate buffered saline*, 0,1 % sodium azide, 2 % *fetal bovine serum*) di inkubasi selama 40 menit

dengan antibodi primer. Setelah dilakukan pembilasan sebanyak tiga kali, sel selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit, diinkubasi pada suhu 4°C dengan antibodi sekunder FITC selama 30 menit, sel kemudian dievaluasi dengan *flow cytometry* dan dianalisis dengan *software Cell Quest* (BD, San Jose, CA) (Polisetty *et al*, 2008)

2.5.2 Sel progenitor pada sklera

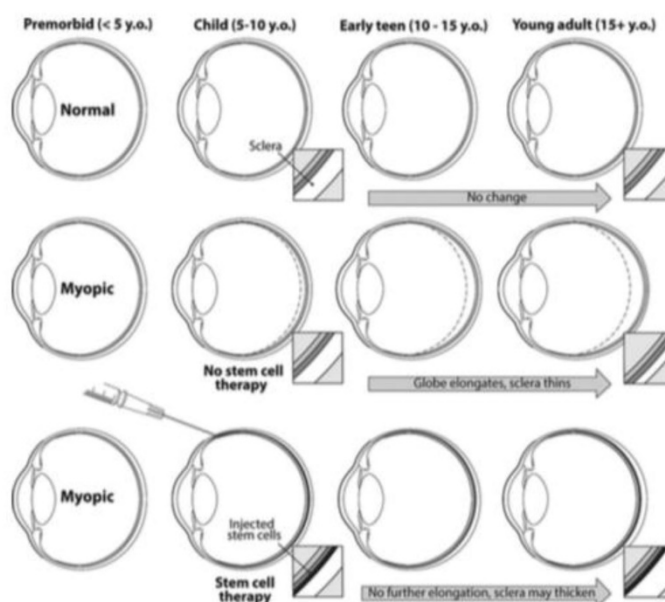
Pada sebuah studi yang dilakukan oleh Tsai *et al.*, dilakukan pemeriksaan jaringan sklera pada hewan coba dan menganalisis kemampuan proliferasi dan kapasitas untuk *self-renewal*. Dari hasil tersebut membuktikan bahwa sel punca ditemukan pada jaringan sklera. *Scleral Stem/Progenitor Cell* (SSPCs) memiliki kemampuan *doubling/ cloning* yang tinggi. Sel tersebut positif terhadap marker mesenkimal permukaan sel punca mesenkimal yaitu Sca-1, CD90.2, CD44, CD105, dan CD73, dan negatif terhadap *hematopoietic markers* CD45, CD11b, Flk1, CD34, dan CD117. SSPCs dengan media (*niche*) yang sesuai juga mampu berdiferensiasi ke arah adipogenik, kondrogenik, dan neurogenik (Tsai *et al*, 2011).

2.5.3 Mekanisme kerja sel punca

Pada awalnya, penggunaan sel punca ditujukan untuk mengembalikan fungsi dari jaringan yang rusak. Sebuah studi oleh Liu *et al* menjelaskan mengenai transplantasi sel punca pada penyakit kornea kongenital. Sel punca diambil dari sel mesenkimal umbilikus neonatus dan hematopoetik umbilikus. Transplantasi dari sel punca mesenkimal secara signifikan mempengaruhi transparansi dan ketebalan stroma dari kornea dibanding sel punca hematopoetik umbilikus. Sel punca mesenkimal mensupresi sitokin inflamasi contohnya IL-2,

MMP-2, dan $IFN\gamma$, serta meningkatkan sitokin anti-inflamasi contohnya IL-6, IL-10, dan memodulasi faktor pertumbuhan $TGF\beta$. Sel punca mesenkimal juga dilaporkan memberikan efek melalui pembentukan eksosom. Eksosom dari sel punca mesenkimal umbilikus dilaporkan dapat masuk dalam keratosit dan sel endotel donor. Sel punca mesenkimal dapat meregulasi respon imunitas dengan mempengaruhi *natural killer* (NK) cells, T cells, dan B cells. Sel punca mesenkimal dapat melakukan *homing* pada beberapa jaringan (Liu *et al*, 2010).

2.5.4 Potensi penggunaan sel punca pada miopia



Gambar 2.13 Representasi skematik pada pemberian terapi stem cell pada model miopia (Janowski *et al*, 2015)

Mekanisme yang terjadi pada proses miopia adalah adanya sklera yang lemah, tidak kaku, dan tipis, yang digambarkan dengan peningkatan elastisitas dan penipisan kolagen. Pada konteks ini, strategi yang dilakukan adalah untuk memperbaiki biomekanik dari sklera dan mencegah progress dari miopia.

Keuntungan dari pemberian sel punca pada *subsclearal space* adalah kemampuan untuk masuk ke dalam retina-sklera *signaling loop* dan jarang menimbulkan komplikasi perdarahan dan *retinal detachment*. Salah satu alternatif lain adalah deposisi dari sel ke dalam jaringan sklera tersebut, tetapi dibandingkan dengan subsklera, sklera memiliki kapasitas yang terbatas. Sehingga, perlu dilakukan injeksi secara multipel dan hal ini secara teknis cukup sulit karena sklera pada miopia sangat tipis. Dopamin merupakan salah satu faktor penting dalam terapi kontrol miopia. Perkembangan mata dan refraksi diregulasi oleh mekanisme *feedback* yang diinisiasi di retina (Janowski *et al.*, 2015).

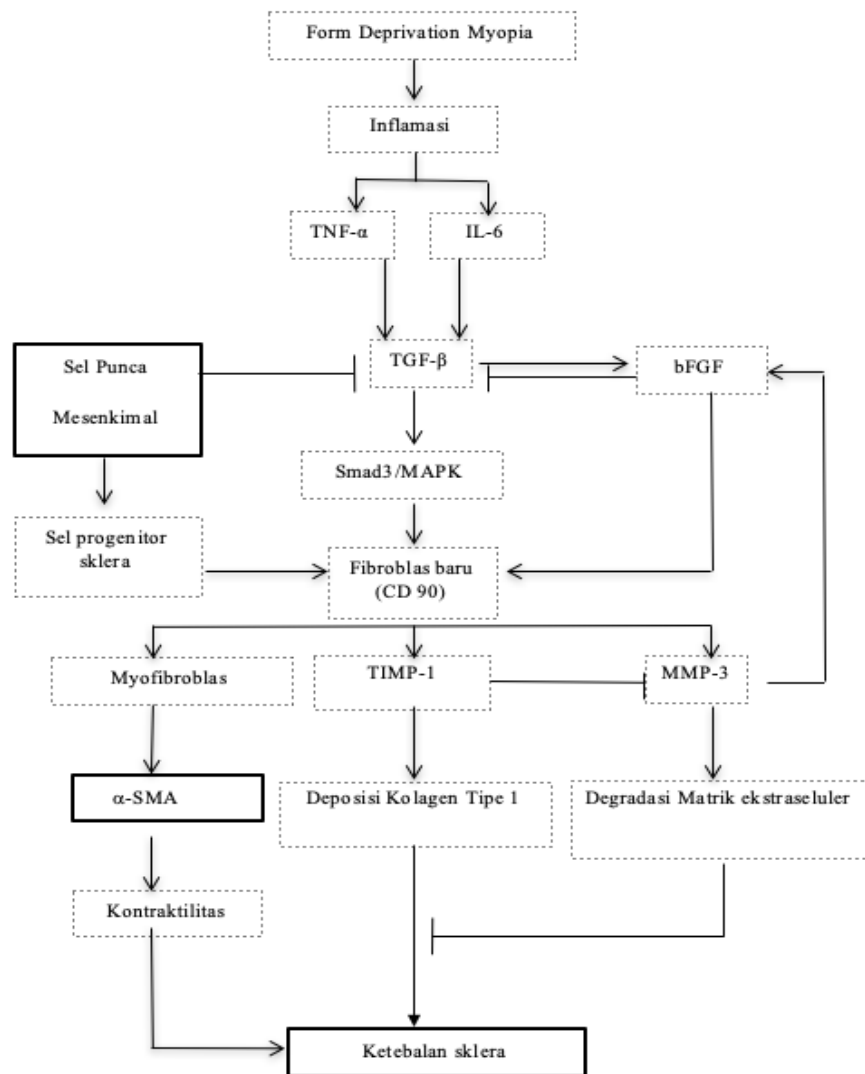
Studi yang dilakukan oleh Tsai *et al* pada tahun 2011 menjelaskan bahwa sklera memiliki sel punca mesenkimal multipoten. Studi dilakukan pada hewan coba tikus, dimana 14 hari setelah dilakukan eksplantasi, sel *sclerocytes* secara cepat akan berkembang menjadi fibroblas sklera. Hal ini menunjukkan kapabilitas sel sebagai sel punca.

Sebuah studi lain menjelaskan mengenai penggunaan transplantasi fibroblas manusia yang dapat menurunkan derajat elongasi aksial. Hal ini ditunjukkan dari fibril kolagen yang telah tersintesis melakukan migrasi ke sklera dan diperkuat dengan sintesis fibril kolagen yang baru dan penurunan elongasi aksial (Shinohara *et al.*, 2017).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan: : tidak diteliti : diteliti

: merangsang : menghambat

Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Form-deprivation myopia menyebabkan proses inflamasi yang mencetuskan peningkatan ekspresi TNF- α dan IL-6. Sitokin inflamasi tersebut mencetuskan peningkatan ekspresi *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang kemudian akan meregulasi faktor pertumbuhan lainnya yaitu *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). TGF- β merupakan sinyal pertumbuhan paling berpengaruh pada hewan model miopia melalui jalur Smad3/MAPK dan berperan penting dalam meregulasi proliferasi fibroblas dan matriks ekstraseluler. Keseimbangan TGF- β dan bFGF berperan penting dalam proliferasi fibroblas, dimana bFGF memberikan inhibisi pada ekspresi TGF- β yang berlebihan. Melalui sinyal TGF- β , fibroblas mengatur ekspresi enzim degradasi matriks ekstraseluler, *matrix metalloproteinase* (MMP) dan *tissue inhibitor matrix metalloproteinase* (TIMP), dan diferensiasi menjadi *myofibroblast* yang bersifat kontraktile. α -SMA merupakan protein *marker* utama pada *myofibroblast* dan memiliki peran penting dalam kontraktilitas fibroblas. Setelah mendapat paparan stress, sel ini dapat secara cepat berkontraksi untuk menghambat ekspansi dari matriks sekitar. Ekspresi α -SMA dapat meningkatkan aktivitas kontraktile fibroblas. Pada mata dengan perkembangan miopia, α -SMA mengalami peningkatan yang mana terdapat peningkatan dari kontraktilitas *myofibroblast*. Pada miopia terjadi penurunan dari kolagen tipe I atau penggantian oleh peningkatan Col2, kekakuan sklera miopia akan menurun, dan elastisitas akan meningkat. Sel punca mesenkimal limbus memiliki fungsi pertumbuhan dan anti-inflamasi. Sel punca mesenkimal limbus yang diinjeksikan intrasklera pada limbus akan memberikan efek melalui mekanisme parakrin, bermigrasi dari anterior hingga ke posterior

sklera (*homing*) sesuai dengan *niche*, sehingga dapat memberikan fungsi regulasi pertumbuhan (TGF- β) dan anti-inflamasi. Sel punca mesenkimal limbus yang diinjeksikan diharapkan dapat meningkatkan kerja progenitor sel sklera. Penggunaan sel punca mesenkimal limbus merupakan novel terapi dalam penelitian miopia.

3.2 Hipotesis Penelitian

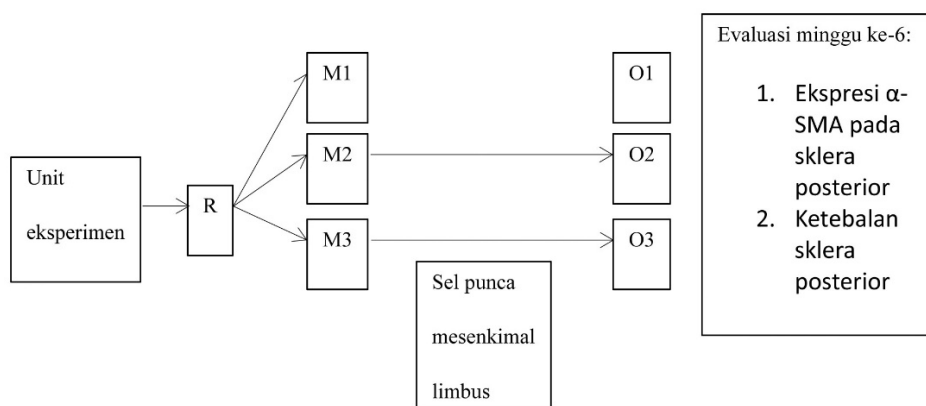
1. Pemberian SPML intrasklera meningkatkan produksi α -SMA pada sklera posterior hewan model *form deprivation myopia*.
2. Pemberian SPML intrasklera meningkatkan ketebalan sklera posterior pada hewan model *form deprivation myopia*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan desain *Randomized Post Test-Only Control Group*.



Gambar 4.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi sampel

M1 : Kelompok kontrol negatif yang tidak dilakukan oklusi

M2 : Kelompok *form deprivation myopia* dan tidak diberi injeksi sel punca mesenkimal limbus intrasklera (dioklusi selama 6 minggu),

M3 : Kelompok *form deprivation myopia* (dioklusi selama 4 minggu diawal), dan diberi injeksi sel punca mesenkimal limbus intrasklera, dilanjutkan oklusi selama 2 minggu (total oklusi 6 minggu).

O1 : Pengamatan kelompok kontrol kontrol negatif

O2 : Pengamatan kelompok perlakuan *form deprivation myopia* yang tidak diberi injeksi sel punca mesekimal limbus intrasklera

O3 : Pengamatan kelompok perlakuan *form deprivation myopia* yang diberi injeksi sel punca mesenkimal limbus intrasklera

4.2 Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi

4.2.1 Unit Eksperimen

Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci putih jenis New Zealand, yang didapatkan dari peternak lokal bersertifikat untuk memastikan usia dan dalam kondisi sehat. Kelinci putih yang digunakan dalam penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Jenis kelinci putih yang dipelihara khusus untuk penelitian.
- b. usia 3-4 bulan dengan berat badan $\pm$ 2-4 kilogram.
- c. Sehat, tampak aktif dan pemeriksaan luar kondisi mata sehat.
- d. Tekanan intraokuler normal antara 15-23 mmHg

Kriteria putus uji: kelinci sakit, mati dan terjadi komplikasi infeksi setelah injeksi intrasklera.

4.2.2 Replikasi

Tiap kelompok sampel akan dihitung menggunakan rumus Lameshow. Penelitian dilakukan pada 3 kelompok hewan coba yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan *form deprivation myopia* yang tidak diberi injeksi sel punca mesenkimal limbus dan kelompok perlakuan *form deprivation myopia* yang diberi injeksi sel punca mesenkimal limbus intrasklera.

Jumlah replikasi dihitung dengan menggunakan rumus Lemeshow:

$$n = \frac{2 \cdot \sigma^2 \cdot \left(Z1 - \frac{\alpha}{2} + Z1 - \beta \right)^2}{(\mu1 - \mu2)^2}$$

Keterangan:

n = jumlah replikasi

$Z_{1-\alpha/2}$ = tingkat kemaknaan, α 5%. $Z_{1-\alpha/2}$ yaitu 1.96

$Z_{1-\beta}$ = power, β = 90%.

$Z_{1-\beta}$ = 1.28

σ = simpangan baku = 3.17

$(\mu_1 - \mu_2)$ = selisih rerata pra dan pasca perlakuan

Jumlah sampel dalam tiap kelompok sebagai berikut:

$$n = \frac{2(3.17)^2 \cdot (1.96 + 1.28)^2}{(308.0 - 298.7)^2}$$

$$= 5.16 \text{ (Shinohara et al., 2017)}$$

Berdasarkan rumus tersebut maka jumlah sampel yang didapat adalah 5.16 ekor untuk masing-masing kelompok. Untuk menghindari kekurangan sampel dari jumlah minimal akibat putus uji, maka jumlah sampel ditambah 20 persen menurut falsifikasi Higgins sehingga masing-masing kelompok adalah 6.19. Untuk mengantisipasi drop out, sampel masing-masing perlakuan ditambah 20% dari hasil rumus, dan didapatkan 8 sampel untuk tiap perlakuan dengan total keseluruhan 24 unit eksperimen.

4.2.3 Randomisasi

Kelinci putih sebanyak 24 akan dibagi menjadi 3 kelompok secara random yaitu kelompok M1, M2, dan M3. Kelinci akan diberi nomor 1 sampai 24 kemudian dibuat secarik kertas yang diberi nomor 1 sampai 24 lalu dilipat. Dan diambil secara random untuk menentukan kelompok.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah sel punca mesenkimal limbus yang dieksplorasi dari jaringan limbus.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah:

1. α -SMA
2. Ketebalan sklera posterior

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dari penelitian ini adalah:

1. Dosis dan cara pemberian SPML
2. Waktu evaluasi
3. Jenis hewan coba
4. Jenis kelamin
5. Umur hewan coba
6. Berat badan hewan coba
7. Tata laksana pemeliharaan
8. Prosedur pembuatan hewan coba

4.4 Instrumen Penelitian

Instrumen untuk pembuatan model *form deprivation myopia* dan tindakan enukleasi untuk preparat jaringan sklera posterior meliputi sarung tangan, gunting bedah, pisau bedah, pinset kolibri, plester dan kassa. Instrumen untuk mengamati

ekspresi α -SMA dengan gelas obyek, mikroskop cahaya. Teknik pengambilan sampel penelitian ini adalah kelinci yang didapat dari institusi penyedia yang memiliki kualifikasi standart dan reputasi yang baik (laboratorium Institut Tropical Disease Surabaya). Sebelum digunakan sebagai subyek penelitian, hewan di evaluasi klinis dan dikondisikan dalam lingkungan sesuai selama 7 x 24 jam untuk meyakinkan bahwa hewan tersebut tidak berpenyakit dan tidak berpotensi menularkan penyakit. Adaptasi dilakukan juga untuk mengetahui pola makan, kandang dan kotorannya. Hewan penelitian dalam pengawasan seorang dokter hewan berkompeten. Setelah didapatkan sampel yang homogen melalui skrining dan kriteria inklusi dan eksklusi di atas dilakukan pembagian kelompok sampel yang homogen secara alokasi random sehingga setiap anggota sampel mempunyai kesempatan yang sama untuk menempati kelompoknya. Untuk pemberian anestesi megunakan kombinasi ketamine dengan diazepam, dan kelinci dipuasakan selama 6 jam untuk mencegah muntah.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Kelayakan etik didapatkan dari Komisi Etik untuk Penelitian Ilmu Dasar dan Klinik di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya sebelum dilakukan penelitian.

4.5.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan jaringan model dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, pembuatan

preparat dan foto dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan dengan jadwal sebagai berikut:

- Bulan ke-1 : Perbaikan proposal
- Bulan ke-2: Pemesanan bahan penelitian
- Bulan ke-3: Penelitian
- Bulan ke-4: Penyusunan Laporan penelitian
- Bulan ke-5: Presentasi hasil penelitian

4.6 Definisi Operasional Variabel

1. Kelinci adalah kelinci putih jenis New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) berumur 3-4 bulan dengan berat badan $\pm$ 2-4 kilogram, kondisi sehat dan tidak ada kelainan pada segmen anterior mata dan tekanan intraokuler normal.
2. Kelinci *form deprivation myopia* adalah kelinci yang mendapat perlakuan bebat mata kanan selama 6 minggu, dan dievaluasi perubahan dari axial length maupun status refraksi dengan *streak retinoscopy*.
3. Sel punca mesenkimal adalah sel yang dieksplorasi dari limbus kelinci jantan usia 3 bulan sebesar 2x2 mm . Pada pasase ke dua sel punca mesenkimal limbus dilakukan karakterisasi menggunakan pewarnaan imunofluorescent. Sel punca mesenkimal akan memberikan hasil positif pada pewarnaan menggunakan CD73, CD90, CD105, dan CD45. Sel

punca mesenkimal limbus diambil pada pasase 4 atau 5 setelah kultur, dengan jumlah sel sebanyak 6×10^5 (Komaratih *et al.*, 2019). Variabel ini menggunakan skala Nominal.

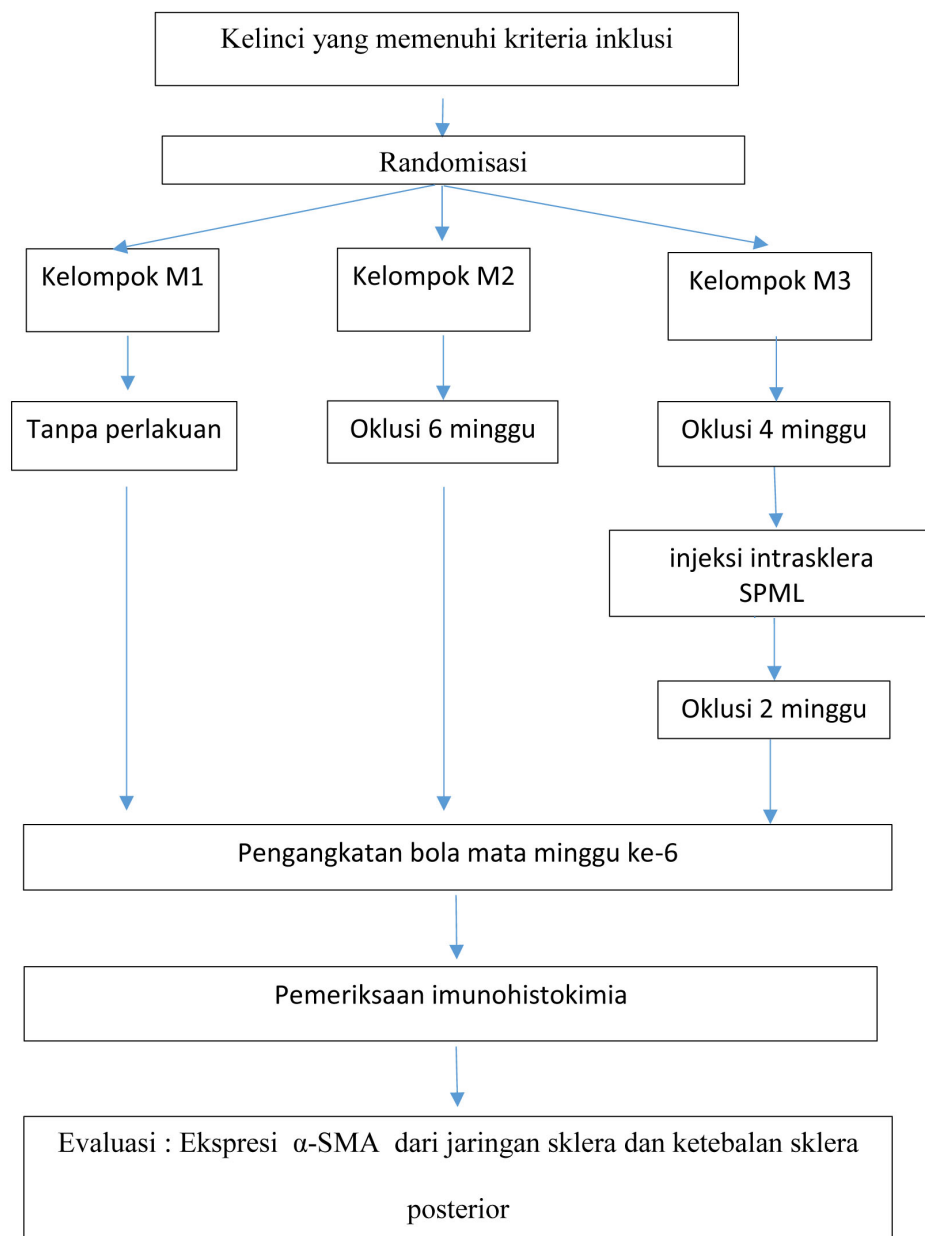
4. Injeksi sel punca mesenkimal intrasklera dibawah lapisan episklera menggunakan jarum 30 G sebanyak 0,1 ml (10^5 sel). Posisi injeksi dilakukan di area 2,5 mm posterior limbus.
5. α -SMA adalah jumlah sel pada syatan sklera yang memberikan reaksi positif pada antibodi α -SMA dengan metode imunohistokimia. Pengamatan dibawah *computerized light microscope* pada pembesaran 100 dan 400 kali. Skoring dilakukan dengan *Immunoreactive Score* (IRS) berupa persentase sel positif dan intensitas *staining*. Variabel ini menggunakan skala Ordinal.
6. Ketebalan sklera posterior adalah pemeriksaan histopatologi menggunakan metode pewarnaan jaringan HE (hematoksilin eosin). Untuk mengukur ketebalan irisan melintang jaringan sklera bagian posterior menggunakan mikroskop yang dilengkapi kamera digital dan pembesaran 100 kali dengan software Olympus cellSens. Variabel ini menggunakan skala Rasio.

4.7 Analisa Data

Analisa deskriptif dengan menghitung mean, modus, median yang disajikan dalam bentuk tabel dan diagram. Data yang terkumpul diolah dengan statistik analitik menggunakan perangkat lunak SPSS. Analisis data digunakan untuk mengetahui pengaruh injeksi sel punca mesenkimal pada ekspresi α -SMA dan

ketebalan sklera. Apabila data berdistribusi normal, analisis menggunakan anova. Apabila distribusi data tidak normal, menggunakan Kruskal Wallis + post hoc Mann Whitney.

KERANGKA OPERASIONAL



Gambar 4.2 Kerangka operasional

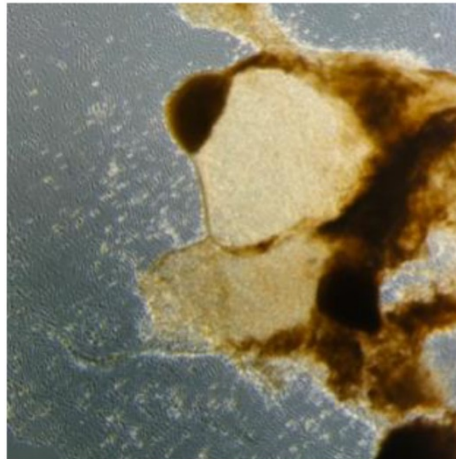
BAB 5

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini merupakan laboratoris *in vivo* pada kelinci yang diinduksi menjadi *form deprivation myopia* dan diberikan injeksi sel punca mesenkimal limbus intrasklera. Desain penelitian adalah *post test group only* dengan mengevaluasi ketebalan sklera dan ekspresi α -SMA pada sklera posterior kelinci dengan pewarnaan IHC.

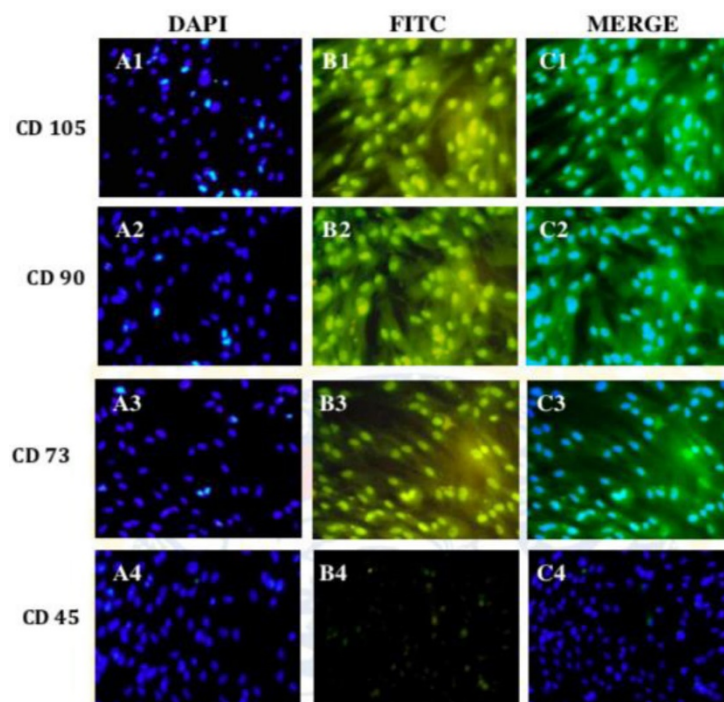
5.1 Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Limbus

Penelitian ini menggunakan unit eksperimen sel punca mesenkimal limbus yang dikultur dari limbus kelinci putih *New Zealand* jantan dengan berat $\pm$ 3000 gram dan usia dua hingga tiga bulan. Penelitian dilakukan di *Stem Cell Research and Development Center Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya. Proses biakan dimulai dengan pengambilan jaringan limbus pada kelinci, kemudian dikultur dengan media kultur primer, α -MEM, yang diganti setiap dua hingga tiga hari. Isolasi sel dilakukan dengan penambahan suplementasi bFGF lima ng/ml untuk meningkatkan kemampuan *sprouting* sel dari tepi eksplan jaringan yang terlihat 24 jam setelah kultur. Sel diisolasi dan diamati secara berkala. Biakan primer sel mencapai konfluensi 90% pada hari keempat. Proses *splitting* dilakukan pada setiap cawan yang telah mencapai konfluensi 100%. Karakterisasi sel punca mesenkimal limbus dilakukan pada biakan sel P-3 dengan pewarnaan *immunositoflourescence* menggunakan antibodi CD45, CD105, CD90, dan CD73.



Gambar 5.1 Kultur primer sel punca mencapai konfluensi 90% pada hari ke-4
(*Inverted Flourescence Microscope*, perbesaran 200x)

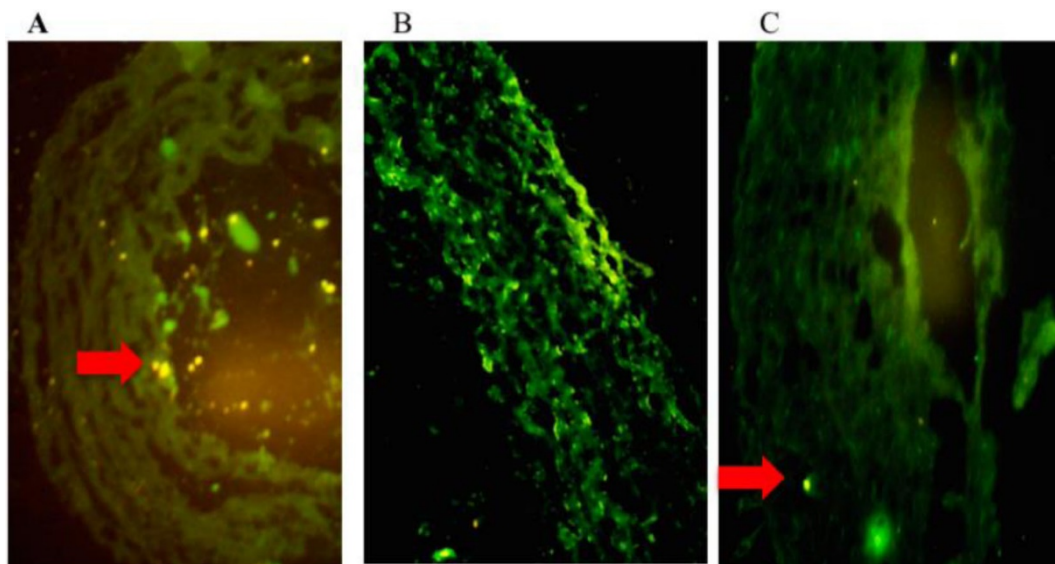
Biakan P-3 menunjukkan ekspresi positif terhadap CD105, CD90, dan CD73, sementara menunjukkan ekspresi negatif terhadap CD45. Ekspresi tersebut mengindikasikan suatu biakan sel punca mesenkimal.



Gambar 5.2 Sel punca mesenkimal limbus pasase (P) 3 menunjukkan hasil positif untuk CD 105, CD 90 , CD 73 dan negatif untuk CD 45. A:DAPI, B :FITC berlabel antibodi, C: gabungan keduanya (*Inverted flourescence microscope*, perbesaran 200x)

5.2 Migrasi dan *Engravement* Sel Punca Mesenkimal Limbus

Sel punca mesenkimal limbus diberikan melalui injeksi intrasklera pada 2,5 mm posterior limbus pada arah temporal jam 10. Label PKH26 diberikan pada sel untuk menilai migrasi pada sel tersebut ke sklera posterior. Pemindaian dengan mikroskop *flourescence* pada *frozen section* sklera posterior kelinci menunjukkan sebaran sel punca mesenkimal limbus di antara jaringan sklera dengan pendaran warna kekuningan. Hal ini menunjukkan bahwa sel punca bermigrasi pada area posterior sklera di area temporal dan nasal. Area temporal memiliki jumlah migrasi sel lebih banyak dibanding area nasal, dimana area nasal merupakan tempat yang lebih jauh dari area injeksi. Sel yang berpendar tidak tampak pada jaringan kontrol sklera normal tanpa pemberian injeksi sel punca mesenkimal.



Gambar 5.3 (A) Gambaran engravement sel punca mesenkimal limbus pada jaringan posterior sklera kelompok FDM + SPML area temporal nervus optikus; (B) Kelompok Kontrol; (C) Sebaran sel berwarna kuning yang berpendar pada jaringan sklera FDM+SPML (anak panah) (Inverted Flourescence Microscope, perbesaran 100x)

5.3 Induksi Hewan Model *Form Deprivation Myopia*

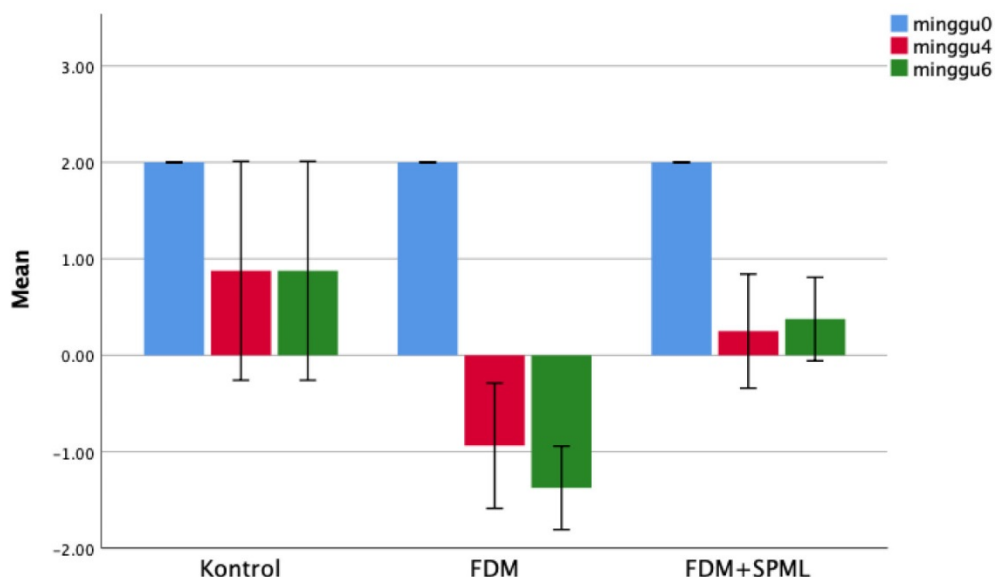
Kelinci putih *New Zealand* diinduksi myopia dengan mengoklusi bola mata kanan selama total 6 minggu. Evaluasi dilakukan dengan melakukan streak retinoskopi dan biometri A-Scan *Quantel Medical* pada awal sebelum oklusi, empat minggu setelah oklusi, dan enam minggu setelah oklusi. Terdapat tiga kelompok yaitu kelompok Kontrol, kelompok yang dilakukan induksi myopia dengan *form deprivation myopia* (FDM), kelompok yang dilakukan induksi myopia dan diberikan injeksi sel punca pada minggu ke-4 (FDM+SPML).

Berdasar analisis deskriptif pada awal pemeriksaan sebelum (minggu ke-0), keseluruhan hasil streak retinoskopi menunjukkan nilai rata-rata Dioptri $2,00 \pm 0,00$ dan perubahan dalam pemeriksaan minggu ke-4 dan ke -6 ($p < 0,05$).

Tabel 5.1 Perubahan status refraksi (pemeriksaan dengan streak retinoskopi) pada sampel penelitian

Kelompok	n	Waktu			p
		Minggu ke-0	Minggu ke-4	Minggu ke-6	
Kontrol	8	$2,00 \pm 0,00$	$0,88 \pm 1,36$	$0,88 \pm 1,36$	0,660
FDM	8	$2,00 \pm 0,00$	$-0,94 \pm 0,78$	$-1,38 \pm 0,52$	0,001*
FDM+SPML	8	$2,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,71$	$0,38 \pm 0,52$	0,001*
p		1,000	0,013*	0,001*	

* $p < 0,05$ = signifikan



Gambar 5.4 Perubahan status refraksi (pemeriksaan dengan streak retinoskopi) pada sampel penelitian

Pada Tabel 5.1 berdasar uji statistik didapatkan perbedaan yang signifikan pada hasil streak retinoskopi mata kelinci kelompok FDM dan FDM+SPML, dan pada periode pemeriksaan minggu ke-4 dan minggu ke-6 ($p < 0,05$). Pada kelompok kontrol tidak tampak perubahan yang signifikan secara statistik dalam tiga periode pemeriksaan ($p < 0,05$). Analisis dengan *Kruskal-Wallis* pada minggu ke-4 menunjukkan perubahan bermakna dari tiga kelompok pemeriksaan ($p < 0,05$). Pada minggu ke-6 juga didapatkan perbedaan signifikan antara tiga kelompok ($p < 0,05$). Namun pada minggu ke-0 tidak didapatkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$).

Peneliti juga melakukan pemeriksaan biometri untuk mengukur perubahan *axial length* dengan A-Scan biometri. Rata-rata panjang *axial length* pada minggu ke-0 pada kelompok kontrol adalah $15,30 \pm 0,20$ mm, pada kelompok FDM adalah $15,57 \pm 0,48$ mm, dan pada kelompok FDM + SPML adalah $15,21 \pm 0,10$

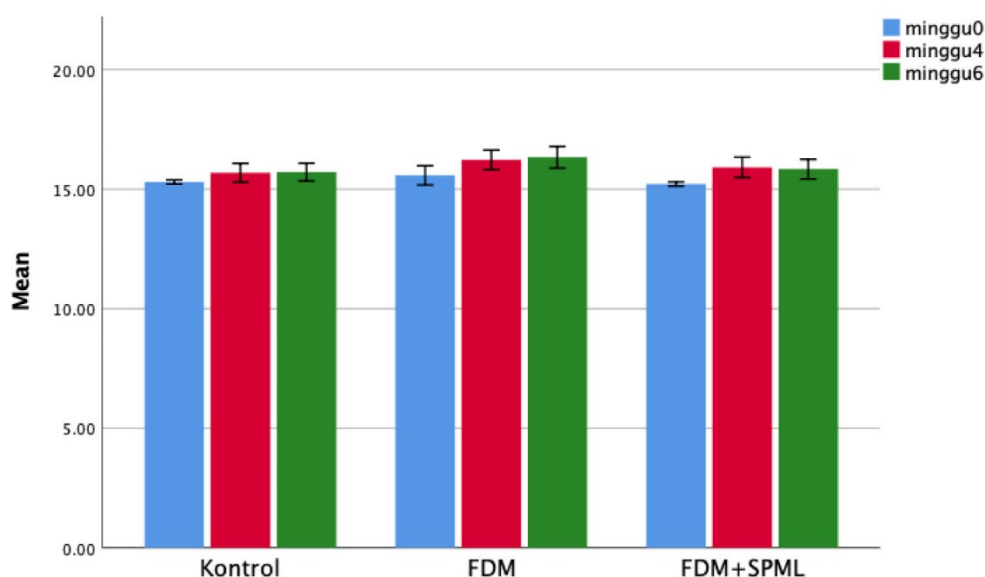
mm. Dalam tabel 2 tampak adanya peningkatan nilai *axial length* pada awal hingga akhir pemeriksaan. Uji statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada masing-masing kelompok dengan rentang tiga periode pemeriksaan ($P < 0,05$).

Uji statistik Kruskal-Wallis menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan *axial length* semua kelompok pada minggu ke-0 dan minggu ke-4, namun didapatkan perbedaan signifikan pada minggu ke-6 ($p < 0,05$).

Tabel 5.2. Perubahan *axial length* pada sampel penelitian

Kelompok	n	Waktu			p
		Minggu ke-0	Minggu ke-4	Minggu ke-6	
Kontrol	8	15,30 ± 0,10	15,68 ± 0,47	15,71 ± 0,44	0,021 *
FDM	8	15,57 ± 0,48	16,22 ± 0,49	16,33 ± 0,54	0,001 *
FDM+SPML	8	15,21 ± 0,10	15,90 ± 0,50	15,84 ± 0,49	0,001 *
p		0,062	0,066	0,049*	

* $p < 0,05$ =signifikan



Gambar 5.5 Grafik perubahan panjang *axial length* sampel penelitian

5.4 Pengaruh Injeksi Sel Punca Mesenkimal Limbus pada Ketebalan Sklera

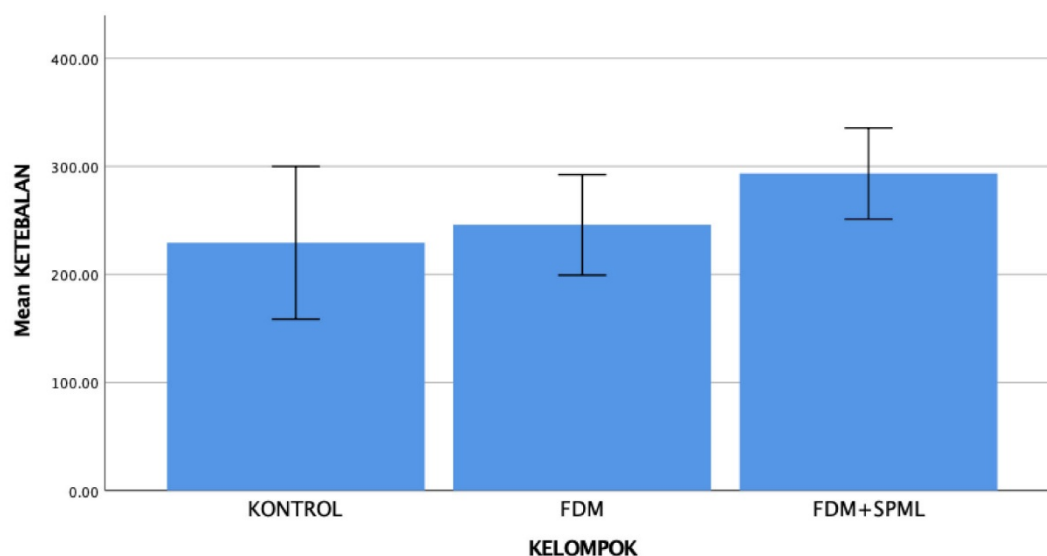
Ketebalan Sklera diperiksa dari potongan jaringan sklera posterior kelinci setelah 6 minggu perlakuan.

Tabel 5.3 Nilai Ketebalan Sklera Pada Sampel Penelitian

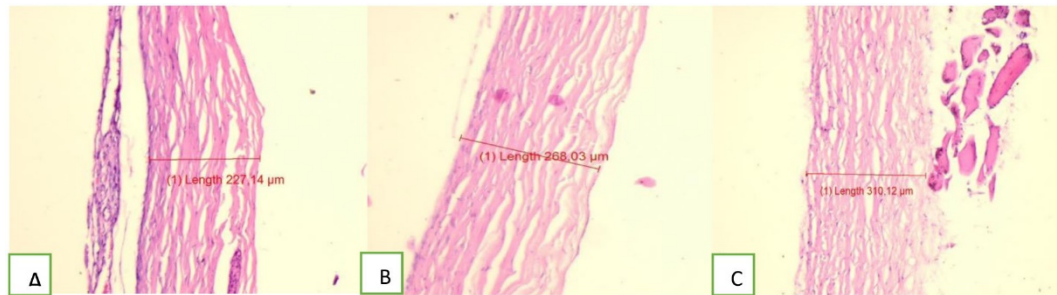
Kelompok	n	Ketebalan Sklera (μm)			p
		Mean $\pm$ SD	Median $\pm$ IQD	Min-Maks	
Kontrol	8	229,27 $\pm$ 84,60	200,29 $\pm$ 33,00 ^a	171-428	0,025*
FDM	8	245,82 $\pm$ 55,61	243,55 $\pm$ 36,00 ^{ab}	174-349	
FDM+SPML	8	293,37 $\pm$ 50,47	281,03 $\pm$ 25,00 ^b	251-408	

*P signifikan $\alpha < 0,05$

^{ab} Superscript yang berbeda menunjukkan ada perbedaan antar kelompok (Mann-Whitney)



Gambar 5.6 Perbedaan nilai ketebalan sklera pada kelompok sampel penelitian



Gambar 5.7 Ketebalan sklera dengan pewarnaan HE pada A) grup kontrol; B) grup model miopia *form deprivation*; C) grup model miopia dengan injeksi sel punca

Uji Statistik dengan Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan ketebalan sklera diantara ketiga kelompok. Pada uji Mann-Whitney untuk antar kelompok didapatkan perbedaan tidak signifikan kelompok kontrol dan kelompok FDM ($229,27 \pm 84,60$ dengan $245,82 \pm 55,61$; $p = 0,279$, $p > 0,05$), sedangkan pada kelompok kontrol dengan FDM+SPML didapatkan perbedaan signifikan ($229,27 \pm 84,60$ dengan $293,37 \pm 50,47$; $p = 0,010$, $p < 0,05$), dan antara kelompok FDM dengan FDM+SPML tidak didapatkan perbedaan signifikan ($245,82 \pm 55,61$ dengan $293,37 \pm 50,47$; $p = 0,083$, $p > 0,05$).

5.5 Pengaruh Injeksi Sel Punca Mesenkimal Limbus pada Ekspresi α -SMA Jaringan Sklera Posterior

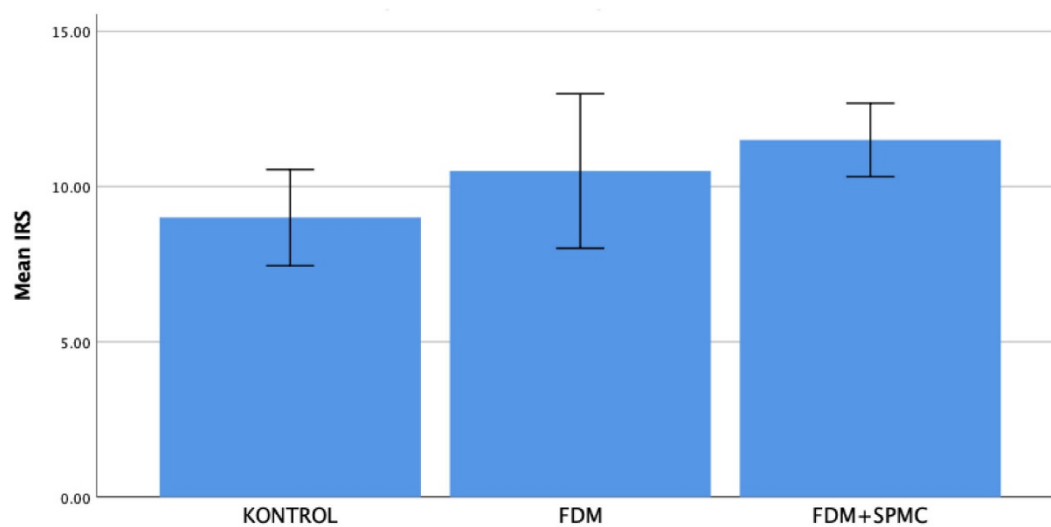
Ekspresi α -SMA diperiksa dari potongan jaringan sklera posterior kelinci setelah 6 minggu perlakuan. Pengecatan immunohistokimia dengan antibodi poliklonal α -SMA. Pemeriksaan dilakukan dengan pembesaran mikroskop 400 x dan dilakukan penilaian terhadap intensitas warna jaringan yang tewarnai α -SMA.

Tabel 5.4 Nilai Median Ekspresi α -SMA

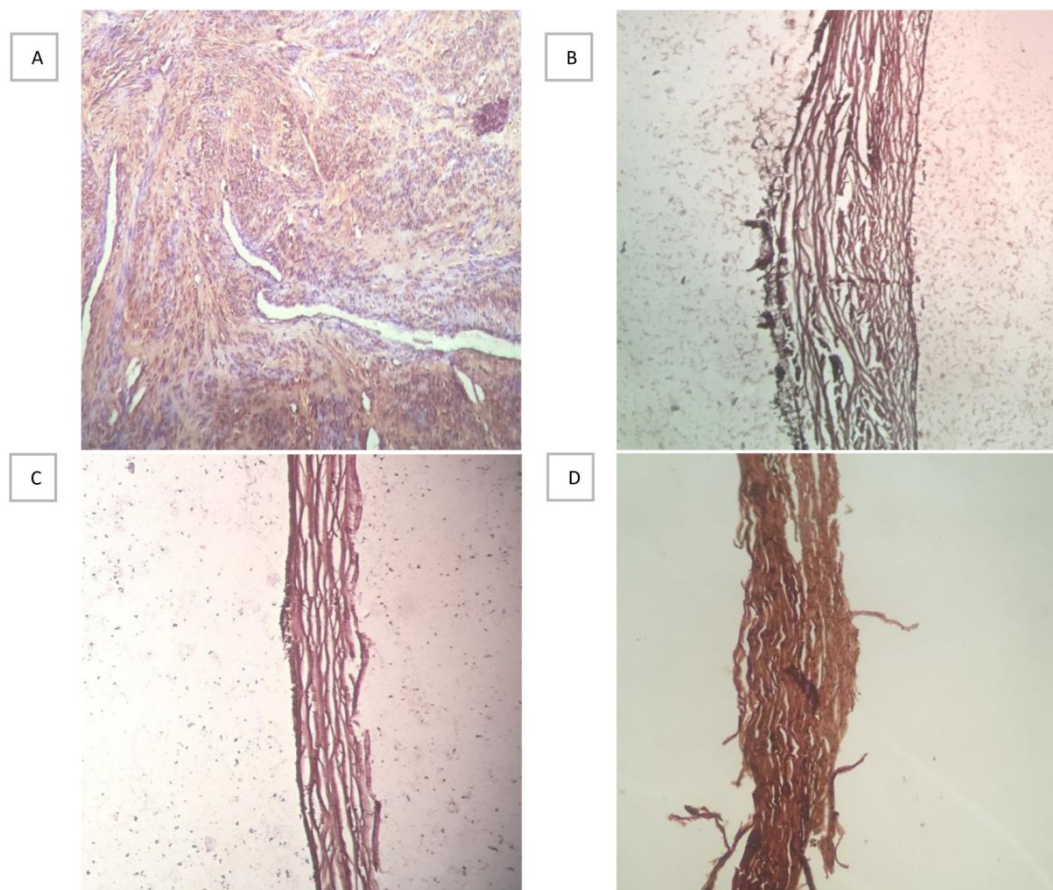
Kelompok	n	Ekspresi α -SMA (IRS)		p
		Median $\pm$ IQD	Min-Maks	
Kontrol	8	8,00 $\pm$ 1,50 ^a	8 – 12	0,047*
FDM	8	12,00 $\pm$ 1,50 ^{ab}	4 - 12	
FDM+SPML	8	12,00 $\pm$ 0,00 ^b	8 – 12	

*Signifikan $p < 0,05$

^{ab} Superscript yang berbeda menunjukkan ada perbedaan antar kelompok (Mann-Whitney)

Gambar 5.8 Perbedaan nilai intensitas ekspresi α -SMA pada kelompok sampel penelitian

Intensitas ekspresi α -SMA dinilai dengan *Immunoreactive Score* (IRS) dimana didapatkan nilai pada ketiga kelompok yaitu kontrol, *form deprivation* (FDM), *form deprivation* dengan injeksi sel punca mesenkimal(FDM+SPML) adalah 8,00 $\pm$ 1,50, 12,00 $\pm$ 1,50, dan 12,00 $\pm$ 0,00.



Gambar 5.9 Pewarnaan imunohistokimia α -SMA pada sklera A) Jaringan kontrol gastrointestinal; B) grup kontrol dengan intensitas lemah; C) grup model miopia *form deprivation* dengan intensitas sedang; D) grup model miopia dengan injeksi sel punca dengan intensitas kuat.

Pada uji statistik dengan Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan signifikan intensitas ekspresi α -SMA diantara ketiga kelompok ($p=0,047$; $p<0,05$). Uji dengan Mann-Whitney menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada kelompok kontrol dengan FDM+SPML ($8,00 \pm 1,50$ dengan $12,00 \pm 0,00$, $p=0,038$; $p<0,05$), dan tidak didapatkan perbedaan signifikan antara kontrol dengan FDM ($8,00 \pm 1,50$ dengan $12,00 \pm 1,50$, $p=0,195$; $p>0,05$) maupun antara FDM dengan FDM+SPML ($8,00 \pm 1,50$ dengan $8,00 \pm 1,50$; $p=0,645$; $p>0,05$).

BAB 6

PEMBAHASAN

Sklera merupakan jaringan target dalam perkembangan miopia. Perkembangan pada mata secara *postnatal* ditunjukkan pada beberapa penelitian terdahulu yang dilakukan pada hewan coba. Eksperimen tersebut menjelaskan bahwa lingkungan visual sekitar dapat mempengaruhi proses pertumbuhan sklera pada *postnatal* dan pertumbuhan sklera dapat ditingkatkan atau diturunkan dengan manipulasi dari lingkungan sekitar. Perubahan pada elongasi mata terkait dengan properti biomekanik sklera. Pada proses perkembangan miopia, sklera mengalami proses *remodeling* aktif yang membuat penipisan progresif dan kelemahan pada jaringan. Penurunan jumlah dan ukuran serabut kolagen menjadi faktor patogenik utama dari miopia progresif, dimana sklera menjadi lebih lemah dan luas (Maza *et al.*,2012; Harper dan Summers, 2016; Liu dan Wang, 2017).

Sklera merupakan jaringan ikat konektif yang terdiri dari lapisan fibrosa dengan matriks ekstraselular yang hampir semua terdiri dari kolagen. Sklera pada kelinci memiliki komponen proteoglikan dan organisasi kolagen yang hampir sama dengan manusia. Komponen seluler sklera terdiri dari fibroblas dan *myofibroblast*. *Myofibroblast* memiliki kemampuan untuk mengekspresikan α -SMA (*Smooth Muscle Actin*) yang memiliki kemampuan potensi kontraktile. Miofibroblas merupakan diferensiasi dari fibroblas dan dapat diidentifikasi dari biomarker vimentin, periostin, dan α -SMA. Di sisi lain, makrofag dan sel dendritik juga didapatkan pada miofibroblas. Sklera terdiri dari serat kolagen dan

serat elastik dengan komponen sel dan pembuluh darah yang sedikit dengan kemampuan perbaikan jaringan rendah. Sklera *porcine* mirip dengan sklera manusia terkait dengan struktur jaringan yang iregular dan jaringan ikat yang padat dengan sebagian besar kolagen yang membentuk struktur lamelar yang padat dengan sejumlah kecil matriks dan sejumlah kecil fibroblas di antara serat. Penelitian yang dilakukan oleh Backhouse & Phillips menjelaskan bahwa sebagian besar dari sel sklera memiliki kemampuan kontraktile pada hewan yang dilakukan *form deprivation*. Fibroblas berperan sebagai sekresi kolagen tipe I, yang merupakan komponen terbesar dari serabut kolagen dan komponen matriks ekstraselular lainnya. Sejauh ini studi yang ada menunjukkan bahwa perubahan penipisan sklera berpengaruh pada penipisan struktur okuli secara keseluruhan (Backhouse dan Phillips, 2010 ; Wu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020).

Beberapa komponen yang berperan dalam proses perkembangan miopia yaitu fibroblas, dopamin, MMP, TIMP, kolagen, *proteoglycan*, *glycosaminoglycan*, *mucopolysaccharide*, serta ekspresi protein lain (Liu *et al.*, 2016). Pada studi ini dilakukan pemusatan pada perubahan ketebalan sklera dan ekspresi α -SMA sebagai penanda *myofibroblast* dalam proses perkembangan miopia dan peran sel punca dalam miopia.

6.1 *Form Deprivation Myopia* pada Hewan Model

Miopia yang diinduksi dengan cara *form deprivation* diikuti dengan perubahan aktivitas dari beberapa perubahan pada neurotransmitter retina, dan beberapa terapi dapat mengubah perkembangan neurotransmitter dari miopia tersebut. Beberapa penelitian terakhir telah terfokus pada asetilkolin dan dopamin

pada keterkaitan dengan *form deprivation*. Neurotransmitter tersebut dimodulasi oleh reseptor adenosin. Adenosin memiliki kemampuan untuk peran homeostasis secara general pada regulasi metabolisme sel, namun juga memiliki proses inhibisi pada pengeluaran neurotransmitter seperti dopamin. Pada hewan yang dilakukan proses *form deprivation* terdapat penurunan dopamin pada retina dan pemberian senyawa dopaminergik menghambat perkembangan dari miopia (Nie *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini 24 kelinci dievaluasi pada awal pemeriksaan dengan menggunakan streak retinoskopi untuk menilai status refraksi dan menggunakan biometri untuk mengukur *axial length*. Data awal minggu nol dari semua kelinci tidak menunjukkan adanya perbedaan baik dalam status refraksi ($p>0,05$) dan panjang *axial length* ($p>0,05$). Evaluasi berikutnya dilakukan pada minggu keempat setelah oklusi kemudian dilanjutkan pada minggu keenam. Pada kedua kelompok yang dilakukan oklusi yaitu kelompok FDM dan FDM+SPML terdapat perbedaan signifikan baik pada status refraksi ($p<0,05$) dan *axial length* ($p<0,05$) setelah enam minggu oklusi. Selain itu terdapat perbedaan yang signifikan antara tiga kelompok pada evaluasi minggu ke-6 baik pada pemeriksaan status refraksi maupun biometri. Kelompok kontrol menunjukkan perubahan status refraksi ke arah emetropia selama enam minggu evaluasi namun tidak menunjukkan perbedaan signifikan secara statistik.

Injeksi sel punca mesenkimal limbus dilakukan pada minggu keempat pada delapan sampel kelompok FDM+SPML. Dari data didapatkan rerata penurunan *axial length* pada minggu keenam dibanding minggu keempat pada grup

FDM+SPML dan status refraksi yang lebih tidak miopia pada minggu keenam dibanding minggu keempat. Selain itu secara statistik didapatkan perbedaan signifikan pada nilai status refraksi dan *axial length* pada grup pemberian injeksi sel punca. Hal ini menunjukkan bahwa injeksi sel punca dapat berperan dalam proses perkembangan miopia.

Hasil studi ini serupa dengan beberapa studi sebelumnya dimana refraksi awal pada kelinci adalah sedikit hipermetropia dan akan mengalami progresivitas hingga dua ratus hari pengamatan. Progresivitas miopia sendiri secara signifikan telah terjadi pada minggu keempat setelah oklusi. Studi model hewan seperti marmut, tupai, dan kelinci menunjukkan progresivitas miopia terjadi cepat dalam beberapa minggu awal setelah oklusi dan menurun setelahnya. Semakin kecil hewan model yang digunakan maka durasi waktu yang dibutuhkan untuk mencapai miopia lebih cepat dibanding hewan yang bertubuh lebih besar (Troilo *et al.*, 2018; Morgan *et al.*, 2013).

Pada studi ini didapatkan perbedaan yang tidak signifikan pada *axial length* minggu keempat namun didapatkan perbedaan yang signifikan pada status refraksi. Status refraksi dilakukan dengan pemeriksaan streak retinoskopi dan pemeriksaan *axial length* dilakukan dengan biometri oleh dua orang *independent* dan diambil rerata dari kedua pengukuran tersebut. Biometri a-scan dilakukan dengan biometri non-imersi sehingga rawan menyebabkan adanya *human error* selama pemeriksaan. Untuk meminimalisir hasil tersebut, maka akan dilakukan pengukuran ulang apabila didapatkan nilai abnormal pada hasil *axial length*.

Elongasi aksial dapat dimodifikasi dari manipulasi lingkungan visual. Sklera menempati 5/6 dari area luas permukaan dari bola mata dan kornea menempati sisanya. Permukaan sklera mengalami pertumbuhan secara paralel dari usia 1 hingga 42 hari dimana terdapat pertumbuhan pesat antara hari 14 hingga 28. Monokular deprivasi merupakan salah satu usaha manipulasi lingkungan visual dimana terkait dengan penurunan TGF- β . Kelinci telah digunakan untuk contoh miopia *form deprivation* dan seperti pada mamalia lain pada mata dengan *form deprivation* didapatkan penurunan ketebalan sklera dan diameter kolagen fibril (Schaeffel dan Feldkaemper, 2015).

6.2 Pengaruh Injeksi SPML Intrasklera pada Ketebalan Sklera pada Sklera Posterior Hewan Model Miopia dengan *Form Deprivation*

Ketebalan sklera menjadi salah satu fokus pada studi perkembangan miopia. Pada studi ini didapatkan data bahwa didapatkan perbedaan pada ketebalan ketiga kelompok. Pada kelompok FDM didapatkan rerata ketebalan yang lebih besar daripada kelompok kontrol meskipun nilai perbedaan tidak signifikan. Hal ini berbeda dengan studi yang ada sebelumnya dimana didapatkan penipisan sklera pada model FDM. Pada studi sebelumnya terdapat perbedaan antara model kontrol dengan FDM, dimana mata yang digunakan untuk kontrol adalah mata kontralateral (Schaeffel dan Feldkaemper, 2015). Pada studi ini hewan kontrol adalah hewan yang berbeda dari yang dilakukan *form deprivation* dan bukan mata kontralateral. Selain itu studi saat ini menggunakan *post test only design* sehingga tidak bisa mengetahui nilai ketebalan awal pada hewan model sebelum dilakukan induksi *form deprivation*. Sementara pada model kontrol dan model

FDM yang diinjeksi sel punca intrasklera didapatkan perbedaan ketebalan signifikan ketebalan sklera ($229,27 \pm 84,60$ dengan $293,37 \pm 50,47$) dimana hal ini sesuai dengan dugaan bahwa sel punca mesenkimal intrasklera meningkatkan ketebalan sklera.

Penipisan sklera pada model miopia berkaitan dengan penyempitan dan disosiasi dari serat kolagen fibril serta penurunan diameter kolagen fibril. Pada studi yang dilakukan Shinohara *et al.*(2017) pada hewan tikus model miopia, terdapat perbedaan ketebalan sklera pada mata miopia dengan kontrol. Hewan model miopia memiliki diameter kolagen fibril lebih kecil pada lapisan tengah dan lapisan luar dibandingkan kontrol, dan didapatkan perbedaan signifikan pada diameter kolagen fibril di daerah posterior namun tidak di daerah perifer. Sklera posterior lebih imatur dari sklera anterior pada proses perkembangan awal sehingga proses *form deprivation* akan lebih berpengaruh pada sklera posterior. Temuan ini menunjukkan bahwa sklera posterior memiliki peran penting pada elongasi *axial length* dan perkembangan miopia.

Studi lain menunjukkan bahwa pada hewan model miopia *guinea pigs* dengan oklusi monokular selama dua minggu tidak menyebabkan perubahan signifikan pada ketebalan sklera. Hal ini berkebalikan dengan studi lain pada monyet, *tree shrews*, dan manusia. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan respon sklera antar spesies terhadap proses *form deprivation*. Hal ini juga berpengaruh pada faktor waktu, dimana pada *tree shrew* penipisan sklera terjadi minimal 12 hari setelah dilakukan oklusi sementara pada monyet terjadi

perubahan derajat miopia setelah 23 hingga 48 bulan (Backhouse dan Phillips, 2010).

Model miopia tinggi membuktikan terdapat penipisan sklera secara signifikan pada studi sebelumnya. Hal ini dijelaskan dengan *scleral bundle* yang lebih kecil pada model miopia tinggi dibanding model emetropia, dan kehilangan jaringan ini disebabkan oleh penurunan kolagen dan mukopolisakarida. Kedua penurunan komponen ini menyebabkan perubahan pada sklera dan matriks ekstraselular. Di sklera terjadi degradasi matriks yang terinduksi oleh proses penurunan TIMP dan MMP. Di matrik ekstraselular terjadi penurunan produksi dari matriks yang baru, disebabkan penurunan kolagen tipe I, proteoglikan, dan glikosaminoglikan. Proses ini akan dilanjutkan dengan suatu proses reaksi sekunder dari tubuh, dimana induksi dari *local stress* pada sel sklera dan perubahan lingkungan menyebabkan perubahan *cell behaviour*. Sel sklera akan berusaha melakukan diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas untuk meningkatkan ketebalan sklera secara struktural. Hal ini akan didukung oleh proses *release* dari sitokin di matriks ekstraselular serta penurunan molekul adhesi berupa integrin. Pada studi yang dilakukan saat ini, penemuan peningkatan ketebalan sklera pada model miopia kemungkinan didapat karena sklera telah melakukan proses sekunder tersebut (Backhouse dan Phillips, 2010; Janowski *et al*, 2015; Wu *et al*, 2018).

Perubahan sklera juga terkait dengan derajat miopia. Sebuah studi menunjukkan bahwa sklera pada manusia dan hewan dengan miopia tinggi lebih tipis secara signifikan dari mata emetropia. Sebagai tambahan, diameter dari serat

kolagen pada sklera lebih tipis pada mata dengan miopia tinggi. Monyet dan *tree shrews* yang dilakukan *form deprivation* juga memiliki sklera yang lebih tipis dan diameter serabut kolagen yang lebih kecil. Hal ini terkait dengan sintesis kolagen tipe 1 pada mata dengan miopia tinggi lebih sedikit daripada non-miopia (Backhouse dan Phillips, 2010).

Studi sebelumnya menjelaskan properti biomekanis sklera secara garis besar berasal dari diameter, distribusi, dan orientasi fibril kolagen. Fibril kolagen dengan diameter lebih besar memastikan kekuatan jaringan lebih tinggi. Evaluasi ini dapat dilakukan dengan *scanning transmission electron microscopy*, yang tidak dilakukan pada penelitian ini (Karl *et al.*, 2016).

Ketebalan sklera juga dipengaruhi oleh berbagai faktor lain yaitu jenis spesies, usia, jenis kelamin, berat badan, dan lokasi pengukuran sklera. Perubahan ketebalan sklera pada kelinci bervariasi terutama pada usia *postnatal*. Pada kelinci terdapat puncak pertumbuhan panjang axial bola mata pada usia hari satu hingga tujuh dan usia 14-28, dan jenis kelamin jantan memiliki axial bola mata lebih panjang. Pada kelinci didapatkan bahwa setelah usia hari 56 didapatkan penurunan pertumbuhan. Namun faktor-faktor ini telah diminimalisir pada studi ini untuk menghindari variasi hasil dimana dilakukan kriteria inklusi pada hewan coba termasuk usia dan berat badan. Lokasi pengukuran pada sklera dilakukan pada sklera posterior pada semua hewan coba dimana dari studi sebelumnya didapatkan bahwa sklera posterior lebih tebal dibanding daerah anterior dan ekuator pada proses perkembangan miopia (Schaeffel dan Feldkaemper, 2015).

Proses *remodeling* sklera sendiri terjadi diikuti peningkatan matriks ekstraselular dan peningkatan produksi *matrix metalloproteases* (MMPs) yang menyeimbangkan penurunan dari *tissue inhibitor matrix metalloproteases* (TIMPs), dimana akhirnya menurunkan sintesis dan proliferasi fibroblas sklera. Secara struktural, hal ini menyebabkan elongasi yang lebih tinggi terutama pada daerah *pole* posterior dari mata miopia tinggi dan dapat menyebabkan *ectasia* lokal (*staphyloma*) (Garcia *et al.*, 2017).

Perubahan sklera tidak hanya didapat dari proses miopia. Stress biomekanik dari studi eksperimental model glaukoma menunjukkan adanya perubahan respon fibroblas. Molekul sinyal integrin mengaktifkan *myofibroblast* dan meningkatkan α -SMA pada sklera model glaukoma. Integrin menghubungkan fibroblas sklera pada kolagen di matriks sklera, sebagai mediasi stress terkait tekanan intraokuli antara sitoskeleton intraselular dan matriks ekstraselular. Integrin memberi stimulus pada TGF- β (Pitha *et al.*, 2018; Oglesby *et al.*, 2016).

Pada hewan coba model miopia, *axial length* pada sklera meningkat karena respon dari proses *form deprivation* atau *image blur*. Sementara pada hewan model glaukoma, sklera mengalami elongasi setelah terdapat peningkatan tekanan intraokuli. Secara superfisial dapat dijelaskan bahwa kedua kondisi tersebut berasal dari perubahan tingkat selular dan biokimia. Namun terdapat perbedaan dari kedua kondisi tersebut. Pada kondisi model miopia didapatkan peningkatan elastisitas dan *creep rate*, sementara pada model glaukoma didapatkan penurunan dari *compliance* mekanik. Meskipun sklera mengalami penipisan pada miopia, hal ini disebabkan oleh penurunan produksi dan degradasi kolagen serta proteoglikan, sedangkan pada

manusia dengan glaukoma memiliki sklera yang lebih tebal dengan gangguan sel ganglion retina (Oglesby *et al.*, 2016). Pada hewan *tree shrew* model miopia didapatkan penurunan integrin pada proses elongasi, berkebalikan dengan model glaukoma. Dan pada hewan *guinea pig* model miopia didapatkan penurunan fibroblas pada sklera posterior, sementara pada model glaukoma didapatkan peningkatan densitas sel pada sklera. Hal ini menunjukkan bahwa proses elongasi pada model miopia memiliki mekanisme yang berbeda dengan penyebab lain seperti model glaukoma, namun memiliki kesamaan perubahan dalam *axial elongation* (Backhouse dan Phillips, 2010; Yang *et al.*, 2015).

Pada sebuah studi dijelaskan bahwa kekakuan sklera lebih tinggi didapatkan pada manusia dibanding hewan coba kelinci dan *porcine*. Pengukuran biomekanis dilakukan dengan *stress-strain test*. Studi tersebut juga menunjukkan bahwa pemberian *collagen cross linking* yang dipaparkan pada riboflavin/ultraviolet A berhasil meningkatkan tingkat kekakuan (*stiffness*) dari sklera kelinci (Zhang *et al.*, 2014).

Fokus terapi miopia pada sklera telah dilakukan pada studi sebelumnya dengan menggunakan *crosslinking* kolagen dan karbohidrat pada sklera yang terbukti meningkatkan rigiditas pada biomekanis sklera dan menghambat porgresifitas miopia. Studi tersebut juga menjelaskan peran ribosa sebagai monosakarida yang meningkatkan reaktivitas *crosslinking* kolagen (Kim *et al.*, 2019).

Sel punca memiliki peran dalam meningkatkan ketebalan sklera pada model miopia. Hal ini diduga bekerja pada dua jalur , yaitu diferensiasi miofibroblas

yang diteliti pada studi ini, dan jalur mekanisme dopamin. Studi sebelumnya menjelaskan *retinal pigment epithelium* (RPE) dapat memodifikasi pertumbuhan sklera dengan mekanisme sinyal neurotransmitter dopamin menuju sklera. Pada miopia, dopamin berkurang di retina sehingga modulasi dopamin dapat menghambat progresivitas miopia (Nie *et al.*, 2012).

Pemberian sinyal dari retina secara biokimia pada sklera terkait perubahan kondisi miopia membuat fibroblas berperan sebagai modulator pada lapisan sklera. Pada miopia matriks ekstraselular akan menjadi lemah dan rigiditas menurun, yang menyebabkan perubahan sel sklera dan degradasi kolagen. Perubahan ini disertai dengan stress pada sel mengakibatkan efek sekunder pada lapisan sklera, dimana sel mengubah kebiasaan (*cell behaviour*) dan lingkungan untuk beradaptasi. Hal ini ditandai dengan diferensiasi fibroblas menjadi *myofibroblast* dan penurunan adhesi molekul integrin ke matriks ekstraselular (Backhouse dan Phillips, 2018). Pada studi ini, sel punca diduga berperan sebagai bantuan untuk adaptasi sel dengan memberikan sel-sel yang dapat berdiferensiasi menjadi *myofibroblast* sehingga sintesis kolagen meningkat dan meningkatkan ketebalan sklera.

6.3 Pengaruh Injeksi SPML Intrasklera pada Ekspresi α -SMA pada Sklera Posterior Hewan Model Miopia dengan *Form Deprivation*

Fibroblas sklera merupakan komponen penting dalam studi perkembangan miopia. Fibroblas merupakan sel yang mengisi matriks ekstraselular sehingga berperan dalam organisasi, produksi, dan regulasi dari struktur matriks. Fibroblas membentuk 25% dari ketebalan sklera. Pada hewan coba tikus, densitas sklera

adalah 4000 sel per mm^3 sehingga diperkirakan terdapat 75000 fibroblas pada sklera tikus. Miofibroblas merupakan hasil diferensiasi fibroblas setelah terjadi *injury* akut atau kronis. α -SMA merupakan *marker* yang diekspresikan oleh miofibroblas. α -SMA berkontribusi pada kekuatan kontraktile pada sel *non-muscle* dan dapat melakukan *upregulation* aktivitas kontraktile pada fibroblas. Selain itu α -SMA berfungsi sebagai salah satu komponen dari proses mekanik dan transduksi). Proporsi yang signifikan dari populasi fibroblas akan berdiferensiasi menjadi miofibroblas, yang dengan bantuan α -SMA dan kaya akan sitoskeleton, terhubung dengan matriks ekstraselular dengan bantuan molekul adhesi disebut integrin. Semua komponen ini berkontribusi dalam regulasi biomekanik pada sklera (Oglesby *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011).

Pada studi ini didapatkan data bahwa pada uji statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan intensitas ekspresi α -SMA diantara ketiga kelompok dengan menggunakan *immunoreactive score* (IRS) ($p=0,047, p<0,05$). Uji statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada kelompok kontrol dengan FDM+SPML ($8,00 \pm 1,50$ dengan $12,00 \pm 0,00$, $p=0,038; p>0,05$) namun tidak didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan FDM ($8,00 \pm 1,50$ dengan $12,00 \pm 1,50$, $p=0,195; p>0,005$) maupun antara FDM dengan FDM+SPML ($8,00 \pm 1,50$ dengan $8,00 \pm 1,50$; $p=0,645; p>0,005$).

Pada studi ini didapatkan peningkatan yang signifikan pada nilai *Immunoreactive Score* (IRS) pada model FDM+SPML. IRS merupakan skor semi-kuantitatif yang awalnya digunakan untuk evaluasi imunohistokimia pada estrogen dan progesteron. IRS merupakan salah satu sistem skoring yang diterima

dengan baik karena mencakup intensitas pewarnaan dan persentase area yang terwarnai. IRS ditentukan dengan perkalian dari nilai intensitas dengan skor 0-3 dan persentase jumlah sel yang positif dengan skor 0-4 sehingga didapatkan skoring antara 0 hingga 12 (Kaemmerer *et al.*, 2012; Specht *et al.*, 2015).

Perubahan intensitas α -SMA pada miopia pernah dilakukan oleh Backhouse dan Phillips (2010) menggunakan *guinea pig* dan dilakukan induksi miopia monokular dengan *form deprivation*. *Myofibroblast* ditemukan baik pada grup kontrol, mata kontralateral dari perlakuan, dan grup perlakuan FDM. Namun tidak didapatkan perbedaan signifikan untuk ketiga grup tersebut. Pada mata kontrol meskipun tidak memiliki kondisi miopia, namun memiliki respon biomekanis yang sama dengan mata FDM, sehingga hal ini mengindikasikan bahwa terdapat dua sinyal kombinasi yang berperan dalam proses miopia. Sinyal pertama dihasilkan dari penurunan kontraksi dari miofibroblas, dan sinyal kedua menghasilkan remodeling sklera. Jika sinyal pertama adalah *yoked intraocular signal*, maka sinyal kedua adalah respon lokal dari mata terkait, sehingga hal ini menjelaskan perubahan pada mata kontrol meskipun tidak ada proses miopia. Studi yang dilakukan saat ini menambahkan bahwa terdapat penambahan intensitas α -SMA sejalan dengan penambahan ketebalan sklera pada model FDM dan FDM+SPML, sehingga menguatkan dugaan bahwa sel punca berperan dalam diferensiasi miofibroblas dan ekspresi α -SMA.

Selain sel punca, proses FDM sendiri dapat mempengaruhi nilai ekspresi α -SMA, hal itu terkait dari proses inflamasi yang timbul dari proses FDM sehingga mempengaruhi mediator inflamasi dalam diferensiasi miofibroblas dan ekspresi

α -SMA. Perubahan fibroblas menjadi *myofibroblast* dan jumlah ekspresi α -SMA dipengaruhi setelah paparan fibroblas oleh dua sinyal utama yaitu sinyal *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) dan stress pada matriks ekstraselular. Secara *in vivo*, kehadiran dua sinyal ini dapat berguna sebagai *opposing* (kondisi miopia) atau *synchronized* (proses *recovery*). Sel yang terpapar peningkatan stress dan penurunan dari TGF- β akan menyebabkan peningkatan dari α -SMA. TGF- β mengubah fenotip sel sklera untuk menghasilkan miofibroblas, dimana miofibroblas akan mengekspresikan α -SMA. Meskipun TGF- β berperan dalam perubahan jumlah α -SMA, namun proses paparan stress pada sklera lebih memberikan efek dominan terhadap jumlah peningkatan *myofibroblast* dan α -SMA. *Myofibroblast* memiliki kemampuan untuk melakukan modifikasi pada lingkungan esktraelular melalui kontraksi dan produksi sel matriks esktraselular yang baru (Jobling *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2018).

Myofibroblast sklera, modifikasi dari fibroblas dengan kemampuan kontraktilel melalui α -SMA telah dibuktikan pada beberapa studi baik pada manusia maupun hewan model. Fibroblas tersebut akan mampu berdiferensiasi menjadi *myofibroblast* dan mengekspresikan α -SMA jika terpapar oleh TGF- β dan stress jaringan lokal Kemampuan kontraktilel dari sel tersebut yang menjadi target terapi untuk melakukan kontrol atau dan bahkan mungkin *reversing* kondisi miopia. TGF- β mengalami *down-regulation* pada mata miopia yang menyebabkan penurunan sintesis kolagen. Namun, dengan adanya tingkat stress yang ekuivalen pada sklera, penurunan TGF- β dapat meningkatkan α -SMA pada sklera, melewati tahapan penurunan sintesis kolagen dan peningkatan stress lokal pada sel. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat

variasi jalur aktivasi untuk menargetkan miofibroblas pada kontrol miopia (Backhouse & Gentle, 2018; Jobling *et al.*, 2009).

Myofibroblast merupakan sel reaktif yang diproduksi pada paparan stress akut atau kronis dan α -SMA merupakan marker dari fenotip *myofibroblast*. *Myofibroblast* memiliki sifat kontraktile yang tinggi dan α -SMA berkontribusi pada aktivitas kontraktile pada sel *non-muscle*. Ekspresi α -SMA sendiri tidak hanya didapatkan pada mata namun juga pada organ lain. Pada syaraf perifer dimana terjadi neuroma traumatik yang terkait nyeri didapatkan ekspresi α -SMA, dapat disebabkan olehn penyebab nyeri atau penanda tidak langsung dari stimulus mekanik lokal. α -SMA juga diteliti dalam kondisi lain seperti diabetik retinopati. Pada satu studi disebutkan bahwa α -SMA memiliki keterlibatan pada diabetik retinopati, dimana α -SMA lebih banyak didapatkan pada sel perivaskular di kapiler retina *pericyte* koroid model diabetik retinopati tetapi ekspresi α -SMA menurun seiring dengan usia (Weng *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2020).

Studi sebelumnya menyebutkan bahwa *myofibroblast* didapatkan di sklera manusia, monyet, *tree shrew*, serta *guinea pig*. Jumlah *myofibroblast* yang berada di sklera berkorelasi dengan kemampuan kontraktile. Pada *guinea pig* yang dilakukan oklusi satu mata (deprivasi monokular) mengalami perbedaan respon elastik yaitu perubahan *vitreous chamber depth* namun tidak didapatkan perbedaan pada jumlah sel sklera dimana jumlah miofibroblas yang tinggi didapatkan baik pada mata normal dan mata dengan deprivasi. Hal ini mengarahkan bahwa terdapat efek lain yang mempengaruhi pada *axial length* selain jumlah sel di sklera. Selain itu pada studi tersebut disebutkan bahwa model

form deprivation menurunkan jumlah sel sklera secara signifikan pada daerah diantara syaraf optik dan 10° nasal (ekuivalen dengan *myopic crescent* pada manusia) dibanding kontrol. Hal ini disebabkan pada mata miopia, terdapat penurunan aliran darah pada daerah *myopic crescent* sehingga diduga penurunan suplai darah ini menurunkan jumlah sel sklera di daerah tersebut. Hal tersebut mengindikasikan bahwa miofibroblas merupakan jenis sel *enigmatic* dimana jika tidak terdapat perubahan signifikan pada jumlah sel tersebut pada model miopia maka kemampuan adhesi fokal dengan integrin dan kemampuan diferensiasi, level ekspresi, dan ekspresi *fibronectin* juga penting menjadi ketertarikan dalam perkembangan studi miopia (Backhouse dan Phillips, 2010).

Target terapi miopia pada studi terdahulu berfokus pada peningkatan sintesis kolagen maupun hambatan degradasi kolagen. Studi yang dilakukan sebelumnya menginjeksikan genipin pada sub-tenon kelinci *New Zealand* model miopia yang dilakukan monokular deprivasi. Genipin, reagen *crosslinking* kolagen alami yang didapatkan dari buah gardenia dan bagian dari terapi herbal, yang dapat menguatkan struktur kolagen sehingga meningkatkan kemampuan biomekanis dengan menguatkan matriks esktraselular pada sklera kelinci (Liu dan Wang, 2017).

Hipotesis pemberian sel punca pada miopia adalah sel punca yang diimplantasi dapat menjadi fibroblas untuk meningkatkan produksi kolagen sklera atau bekerja pada jalur dopamin untuk memodulasi perkembangan miopia (Janowski *et al*, 2015). Pada studi ini, model FDM+SPML mengalami peningkatan intensitas α -SMA sehingga hal ini mengindikasikan bahwa peran sel

punca yaitu berdiferensiasi menjadi fibroblas yang berperan dalam peningkatan produksi kolagen sklera.

Hipotesis peran sel punca juga berperan terkait proses *hypoxia* dan stress oksidatif yang terjadi pada miopia. Stress oksidatif merupakan peran penting pada perkembangan miopia dimana beberapa studi telah menunjukkan efek elemen antikosidan seperti asam askorbat, tokoferol, glutation, dan β –*carotene* yang berperan sebagai *rebuilding* dari sklera. Jaringan retina merupakan salah satu pengguna konsumsi oksigen terbanyak pada tubuh, sehingga hal ini menentukan dari ekspresi yang berlebihan dari *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan salah satu kontributor terbanyak pada stress oksidatif. Sebuah studi menunjukkan penurunan aktivitas metabolik pada mata miopia yang berpengaruh pada tingkat stress oksidatif (Coviltir *et al*, 2019).

Salah satu teori lain menjelaskan bahwa *scleral hypoxia* merupakan target terapi pada miopia. Sinyal *hypoxia* seperti *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) akan teraktivasi pada sklera model miopia. Secara eksperimental didapatkan peningkatan *up-regulation* pada sklera model miopia. Selain itu, paparan *hypoxia* (5 % oksigen) mendukung diferensiasi *myofibroblast* dengan *down-regulation* dari kolagen tipe I pada fibroblas sklera manusia (Wu *et al.*, 2018). Studi lain menyebutkan bahwa terdapat Wnt/ β - catenin *signaling pathway* yang dimodulasi oleh TGF- β merupakan salah satu jalur dalam perkembangan miopia dan aktivasi α –SMA. Selain itu Smad3 merupakan protein efektor yang membantu proses sinyal TGF- β dari luar fibroblas ke nukleus, salah satu jalur yang memungkinkan untuk mengaktivasi α –SMA dan diferensiasi *myofibroblast*. Aktivasi dari Wnt/ β -

catenin signaling pathway terlihat pada model primer fibroblas sklera pada model miopia *form deprivation*, dimana jalur ini menurunkan ekspresi dari kolagen tipe I oleh TGF- β yang menyebabkan *remodeling* sklera (Carthy, 2017; Li *et al*, 2016).

Salah satu mekanisme lain pada perkembangan miopia tinggi adalah adanya proses inflamasi bahwa proses inflamasi derajat rendah dapat menjadi salah satu peran penting pada miopia tinggi dimana hal ini menyebabkan IL-6 dan MMP-2 meningkat pada model miopia, penipisan sklera, dan elongasi bola mata secara progresif (Yuan *et al*, 2019).

Terapi miopia sendiri banyak dilakukan dengan dasar patofisiologi diatas seperti *hypoxia* jaringan, inflamasi, stress oksidatif, dimana semuanya saling berkaitan. Studi ini berfokus pada perubahan sklera secara struktural dan menunjukkan kapabilitas sel punca dalam meningkatkan intensitas *myofibroblast* sebagai dasar sintesis jaringan sklera yang berperan dalam proses miopia.

6.4 Potensi Penggunaan SPML sebagai Pencegahan Progresivitas Miopia

Terapi miopia sudah banyak dilakukan pada berbagai studi. Hipotesis pemberian sel punca pada miopia pada studi sebelumnya adalah sel punca yang diimplantasi dapat menjadi fibroblas untuk meningkatkan produksi kolagen sklera atau bekerja pada jalur dopamin untuk memodulasi perkembangan miopia (Janowski *et al.*, 2015).

Sel punca pada studi ini diambil dari limbus kornea hewan coba. Epitel kornea diperbarui dengan sel punca dan terletak di lapisan basal dari epitel basal limbus epitel pada daerah yang disebut *niche*. *Niche* ini berperan dalam properti *maintenance* dari sel punca (Luznik *et al*, 2016).

Dopamin memiliki peran penting pada proses perkembangan miopia sehingga hal ini merupakan salah satu kunci penggunaan sel punca pada studi miopia. Sel punca telah digunakan untuk penyakit Parkinson dan dopamin juga menjadi kunci utama dari keberhasilan terapi. Sel punca mesenkimal mampu melakukan induksi berbagai macam sel dan menghasilkan dopamin. Hal itu sudah terbukti bahwa sel punca mesenkimal efektif pada eksperimen terapi Parkinson. Strategi ini yang dapat dilakukan pada miopia. Terkait dengan sinyal dopamin, kemampuan *basic fibroblast growth factor* (bFGF) dan ko-transplantasi dari sel yang memproduksi bFGF juga merupakan komponen yang membantu fungsi dari sel dopamin (Janowski *et al.*, 2015).

Sebuah studi memberikan *7-methylxantine* secara intrasklera pada mata kelinci model *form deprivation* dan didapatkan peningkatan diameter serat kolagen pada model miopia dibanding kontrol. *7-methylxantine* merupakan reseptor adenosine antagonis nonselektif. Reseptor adenosin terbukti ditemukan pada sklera *guinea pigs*. Fokus studi miopia adalah pada hubungan dopamin dan asetilkolin, dan reseptor adenosine berperan sebagai modulator pada neurotransmitter tersebut. Studi lain menyebutkan bahwa pada model miopia terdapat penurunan jumlah dopamin pada hewan model monokular deprivasi *tree shrews*. Inhibisi dari reseptor A2A meningkatkan transisi reseptor dopamin D2 postsinaptik, aktivasi dopamin D2 berperan sebagai antagonis dari aktivasi tonik reseptor A2, dan inhibisi dari reseptor dopamin D2 membuat aktivasi reseptor kuat adenosine A2 (Nie *et al.*, 2012).

Sel punca mesenkimal memiliki kemampuan untuk diferensiasi menjadi sel *multi-lineage*. Sel punca dapat dikategorikan sebagai sel punca embrionik, sel punca *induced pluripotent*, dan sel punca dewasa. Sel punca mesenkimal merupakan sel punca dewasa yang didapat dari manusia maupun hewan. Sel punca mesenkimal telah dibuktikan dapat dikultur dan diisolasi menjadi berbagai jaringan seperti jaringan adiposa, cairan amnion, endometrium, jaringan gigi. Selain itu sel punca mesenkimal memiliki kemampuan immunomodulator dan sekresi sitokin dan imunereseptor yang meregulasi lingkungan pada jaringan *host*.

Peran sel punca mesenkimal dalam lapisan intrasklera adalah kemungkinan untuk inkorporasi dalam *retina-sclera signaling loop*. Injeksi intrasklera secara rutin digunakan untuk distribusi obat tanpa menyebabkan perdarahan atau *retinal detachment* sehingga cukup valid untuk menjadi rute pemberian sel punca. Selain itu *intrascleral space* juga sangat adaptatif dan fleksibel (Ullah *et al.*, 2015).

Studi lain menjelaskan bahwa pemberian transplantasi fibroblas manusia pada sklera dapat menurunkan perkembangan miopia dengan cara menginduksi sintesis fibril kolagen. Hal itu menunjukkan dugaan bahwa pemberian fibroblas dapat menurunkan progresivitas miopia dengan menguatkan sklera dan menurunkan derajat dari *myopic shift*. Pemberian transplantasi fibroblas ini meningkatkan sintesis dari *coll* sehingga membentuk fibril kolagen matur dan meningkatkan *reinforcement* sklera (Shinohara *et al.*, 2017).

Miopia juga memiliki peran faktor genetik dimana *genome wide association study* membuktikan bahwa terdapat lokus genome terkait miopia dimana hal ini turut menjelaskan patofisiologi dari miopia (Meguro *et al.*, 2020).

Penggunaan sel punca mesenkimal sendiri di bidang mata telah dilakukan pada manusia. Sebuah studi menjelaskan sel punca apat membantu proses penyembuhan baik anatomis dan fungsional pada macula pada kasus *macular hole* luas dan refrakter (Zhang *et al*, 2017).

6.5 Keterbatasan Penelitian

Studi ini merupakan studi eksperimental *in vivo* dengan *post-test only design* sehingga tidak dapat membedakan perbedaan perubahan variabel yang diteliti sebelum dan sesudah perlakuan yaitu ketebalan sklera dan intensitas α -SMA. Selain itu peneliti juga tidak dapat mengetahui puncak *homing* sel punca mesenkimal. Pemberian sel punca mesenkimal limbus diberikan pada satu sesi dan satu lokasi. Teknik injeksi sel punca mesenkimal dilakukan menggunakan jarum 30G tanpa panduan *imaging*, sehingga peneliti tidak dapat memastikan bila seluruh sel telah masuk pada jaringan intrasklera. Pada perhitungan hasil IHC dilakukan dengan teknik manual sehingga *human error* tinggi dan intensitas dilakukan dengan *grading* yang bersifat ordinal. Pemeriksaan ketebalan sklera dilakukan pada satu lokasi sklera dan tidak dibandingkan dengan mata kontralateral dan lokasi sklera lain sebagai pembanding.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian ini, injeksi intrasklera sel punca mesenkimal limbus pada hewan model *form deprivation myopia* didapatkan perubahan salah satu *biomarker* dari struktur sklera yaitu:

1. Pemberian injeksi intrasklera sel punca mesenkimal limbus mampu meningkatkan intensitas α -SMA pada sklera posterior hewan model
2. Pemberian injeksi intrasklera sel punca mesenkimal limbus mampu meningkatkan ketebalan sklera pada sklera posterior hewan model

7.2 Saran

Saran terkait penelitian ini adalah:

1. Melakukan penelitian lanjutan pada ketebalan sklera dengan meneliti diameter serat kolagen fibril.
2. Injeksi sel punca mesenkimal menggunakan *imaging* untuk mengurangi resiko *false route* dan memastikan seluruh sel masuk jaringan intrasklera.
3. Melakukan penelitian lanjutan menggunakan hewan model dengan durasi berbeda berdasarkan tujuan pemeriksaan dan pemeriksaan mata kontralateral pada hewan model miopia. *Tracing* migrasi sel punca dapat dilakukan pada hari ke-tiga, satu minggu, dan dua minggu setelah injeksi.

4. Pemeriksaan ketebalan sklera dilakukan pada beberapa lokasi sklera diantaranya sklera anterior dan sklera posterior.
5. Perhitungan intensitas α -SMA dilakukan menggunakan *software* sehingga memberikan data yang lebih akurat dan meminimalisir *human error*.
6. Melakukan penelitian pada klinik fase satu dengan modifikasi yang disesuaikan pada manusia.

BAB 8

PENUTUP

Demikian telah dilaporkan penelitian mengenai Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenkimal Limbus Terhadap α -SMA dan Ketebalan Sklera Pada Hewan Model *Form Deprivation Myopia* (Studi Eksperimental *In Vivo* Pada *Oryctolagus cuniculus*). Kritik dan saran yang membangun kami harapkan untuk perbaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Augello, A., T. Kurth, and C. Bari. 2010. Mesenchymal Stem Cells: A Perspective from In Vitro Cultures to In Vivo Migration and Niches. *European Cells and Materias*. 20:121-133.
- Backhouse, S. and J. Phillips. 2010. Effect of Induced Myopia on Scleral Myofibroblasts and In Vivo Ocular Biomechanical Compliance in the Guinea Pig. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 51(12): 6162-6172.
- Backhouse, S. and A. Gentle. 2018. Scleral Remodelling in Myopia and Its Manipulation: A Review of Recent in Scleral Strengthening and Myopia Control. *Annals of Eye Science*. 3(5): 1-15.
- Carr, B. 2017. Molecular Targets of Atropine - And Mamba Toxin 3 – Mediated Inhibition of Form - Deprivation Myopia in The Chick: A Case of Mistaken Receptor Identity [Thesis]. Neuroscience Department. University of Calgary, Canada.
- Carthy, J. 2017. TGF- β Signalling and The Control of Myofibroblast Differentiation: Implications for Chronic Inflammatory Disorders. *Journal of Cellular Physiology*. 233:1-8.
- Chen, K., E. Hsi, C. Hu, W. Chou, C. Liang, and S. Juo. 2012. MicroRNA-328 may influence myopia development by mediating the PAX6 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 53: 2732–2739.
- Coviltir, V., M. Burcel, A. Cherecheanu, C. Ionescu, D. Dascalescu, V. Potop, M. Burcea. 2019. Update on Myopia Risk Factors and Microenvironmental Changes. *Journal of Ophthalmology*. 46:92-99.
- Dong, F., Z. Zhi, and M. Pan. 2011. Inhibition of Experimental Myopia by A Dopamine Agonist: Different Effectiveness Between Form Deprivation and Hyperopic Defocus In Guinea Pigs. *Mol Vis*. 17: 2824–2834.
- Garcia, M., A. Jha, K. Healy, C. Wildsoet. 2017. A Bioengineering Approach to Myopia Control Tested in a Guinea Pig Model. 58:1875-1886.
- Harper, A., and J. Summers. 2016. The Dynamic Sclera: Extracellular Matrix Remodeling in Normal Ocular Growth and Myopia Development. *Exp Eye Res*. 133:100-111.

- Holden, B., T. Fricke, and D. Wilson. 2016. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology*. 123:1036–1042.
- Janowski, M., J. Bulte, J. Handa, D. Rini, and P. Walczak. 2015. Concise Review: Using Stem Cells to Prevent Progression of Myopia- A Concept. *Stem Cells*. 33:2104-2113.
- Jobling, A., A. Gentle, R. Metlapally, B. McGowan, and N. McBrien. 2009. Regulation of Scleral Cell Contraction by Transforming Growth Factor- β and Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 284(4):2072–2079.
- Kaemmerer, D., L. Peter, A. Lupp, S. Schulz, J. Sanger, R. Baum, V. Prasad, M. Hommann. 2012. Comparing of IRS and Her2 as Immunohistochemical Scoring Schemes in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 5(3):187-194.
- Kang, P., and H. Swarbrick. 2011. Peripheral Refraction in Myopic Children Wearing Orthokeratology and Gas-Permeable Lenses. *Optom. Vis. Sci*. 88:476–482.
- Karl, A., F. Makarov, C. Koch, N. Korber, C. Schuldt, M. Kruger, A. Reichenbach, P. Wiedemann, A. Bringmann, H. Iseli, and M. Francke. 2016. The Ultrastructure of Rabbit Sclera After Scleral Crosslinking with Riboflavin and Blue Light of Different Intensities. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 10:121-128.
- Kim, S., S. Kim, Y. Choi, D. Park, and J. Lee. 2020. Alpha-Smooth Muscle Actin-Positive Perivascular Cells in Diabetic Retina and Choroid. *Int. J. Mol. Sci*. 21:1-15.
- Kim, T., W. Kim, S. Choi, and K. Jin. 2019. Effects of Scleral Collagen Crosslinking with Different Carbohydrate on Chemical Bond and Ultrastructure of Rabbit Sclera: Future Treatment for Myopia Progression.
- Komaratih, E., Y. Rindiastuti, H. Susilowati, N. Wijayanti, S. Dranindi, Y. Primitasari, N. Nurwasis, W. Artini, F. Rantam, and C. Prakoeswa. 2019. Antifibrotic Effects of Limbal Mesenchymal Stem Cells-Conditioned Media (LMSCs-CM) on Human Tenon's Fibroblasts (HTFs) in Glaucomatous Eyes: Comparison with Mitomycin C. *Sch. Acad. J. Biosci*. 7(1): 4–12.
- Li, M. Y. Yuan, Q. Chen, R. Me, Q. Gu, Y. Yu, M. Sheng, and B. Ke. 2016. Expression of Wnt/ β - Catenin Signaling Pathway and Its Regulatory Role in Type I Collagen with TGF- β 1 in Scleral Fibroblasts from an Experimentally Induced Myopia Guinea Pig Model. *Journal of Ophthalmology*. 55:126-136.

- Lin H, C. Wei, C. Chang, T. Chen, Y. Hsu, Y. Hsieh, H. Chen, L. Wan. 2016. Role of Chronic Inflammation in Myopia Progression: Clinical Evidence and Experimental Validation. *EbioMedicine*. 10: 269–281.
- Liu, H., J. Zhang, C. Liu, I. Wang, M. Sieber, J. Chang. 2010. Cell Therapy of Congenital Corneal Diseases with Umbilical Mesenchymal Stem Cells: Lumican Null Mice. *Plos One*. 5(5):107-113.
- Liu, T., and Z. Wang. 2017. Biomechanics of Sclera Crosslinked using Genipin in Rabbit. *Int. J. Ophthalmol*. 10(3):355-361.
- Liu, X., W. Zhe, R. Wang, F. Zhao., P. Shi, Y. Jiang, and X. Pang. 2013. Direct Comparison of the Potency of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Amnion Tissue, Bone Marrow and Adipose Tissue at Inducing Dermal Fibroblast Responses to Cutaneous Wounds. *Int. J. Mol. Med*. 31: 407-415.
- Liu, Y., P. Zhang, J. Pan, M. D’Souza, C. Dufresne, R. Semba, J. Qian, D. Edward. 2016. Anatomical Differences of the Protein Profile in the Rabbit Sclera During Growth. *Exp Eye Res*. 154:53-63.
- Luznik, Z., M. Hawlina, E. Malicev, M. Bertolin, A. Kopitar, A. Ihan, S. Ferrari, and P. Schollmayer. 2016. Effect of Cryopreserved Amniotic Membrane Orientation on the Expression of Limbal Mesenchymal and Epithelial Cell Markers in Prolonged Limbal Explant Cultures. *Plos One*. 10:131-137.
- Maza, M., J. Tauber, and C. Foster. 2012. Structural Considerations of the Sclera. In: *The Sclera*. 2nd ed. Springer. New York. 1-27.
- Mcbrien, N. 2012. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta. *Experimental Eye Research*. 114:128-140.
- Meguro, A., T. Yamane, M. Takeuchi, M. Miyake, Q. Fan, And W. Zhao. 2020. Genome-Wide Association Study in Asians Identifies Novel Loci for High Myopia and Highlights a Nervous System Role in Its Pathogenesis. *Ophthalmology*. 10:106-115.
- Metlapally, R., and C. Wildsoet. 2016. Scleral Mechanisms underlying Ocular Growth and Myopia. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 134: 241–248.
- Morgan, I., K. Ohno-Matsui, and S. Saw. 2012. Myopia. *Lancet*. 379:1739–1748.
- Morgan, I., R. Ashby, Regan S, and L. Debora. 2013. Form Deprivation and Lens-Induced Myopia: Are They Different? *Ophthalmic Physiol. Opt*. 33(3): 355–361.

- Nie, H., L. Huo, X. Yang, Z. Gao, J. Zeng, K. Trier, and D. Cui. 2012. Effects of 7-methylxanthine on Form-Deprivation Myopia in Pigmented Rabbits. *Int. J. Ophthalmol.* 5(2):133-137.
- Oglesby, E., G. Tezel, E. Kimball, M. Steinhart, J. Jefferys, M. Pease, and H. Quigley. 2016. Scleral Fibroblast Response to Experimental Glaucoma in Mice. *Molecular Vision.* 22:82-99.
- Pan, C., D. Ramamurthy, and S. Saw. 2012. Worldwide Prevalence and Risk Factors for Myopia. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 32: 3–16.
- Pitha, I., E. Oglesby, A. chow, E. Kimball, M. Pease, J. Schaub, H. Quigley. 2018. Rho-Kinase Inhibition Reduces Myofibroblast Differentiation and Proliferation Scleral Fibroblasts Induced by Transforming Growth Factor β and Experimental Glaucoma. *Trans Vis Sci Tech.* 7(6):6.
- Polisetty, N., A. Fatima, S. Madhira, V. Sangwan, and G. Vemuganti. 2008. Mesenchymal cell from Limbal Stroma of Human Eye. *Mol Vis.* 14:431-442.
- Resnikoff, S., D. Pascolini, S. Mariotti, and G. Pokharel, 2008. Global magnitude of Visual Impairment caused by Uncorrected Refractive Errors in 2004. *World Health Organ.* 86: 63–70.
- Schaeffel, F. and M. Feldkamper. 2015. Animal Models in Myopia Research. *Clin. Exp. Optom.* 98:507-517.
- Shinohara, K., T. Yoshida, H. Liu, S. Ichinose, T. Ishida, K. Nakahama, N. Nagaoka, and M. Moriyama. 2017. Establishment of Novel Therapy to Reduce Progression of Myopia in Rats with Experimental Myopia by Fibroblast Transplantation on Sclera. *Journal of Tissue Engineering.* 52:120-128.
- Specht, E., D. Kaemmerer, J. Sanger, R. Wirtz, S. Schulz, and A. Lupp. 2015. Comparison of IRS, HER2/neu-Score and H-Score for the Immunohistochemical Evaluation of Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms. *Histopathology.* 67(3):368-377.
- Troilo, D., E. Smith, D. Nickla, R. Ashby, A. Tkachenko, L. Ostrin, and L. Jones. 2019. Report on Experimental Models of Emmetropization and Myopia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 60(3):31-88.
- Tsai, C., P. Wu, and M. Fini. 2011. Identification of Multipotent Stem/Progenitor cells in Murine Sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52:5481–5487.

- Ullah, I., S. Raghavendra, and R. Jin. 2015. Human Mesenchymal Stem Cells - Current Trends and Future Prospective. *Biosci. Rep.* 35:191-201.
- Wang, F., L. Zhao, H. Li, D. Li, M. Zhou, Q. Zhou, and L. Xie. 2020. Scleral Defect Repair using Decellularized Porcine Sclera using a Rabbit Model. *Xenotransplantation*.2:181-186.
- Wang, Q., G. Zhao, S. Xing, L. Zhang, and X. Yang. 2011. Role of Bone Morphogenic Proteins in Form-Deprivation Myopia Sclera. *Molecular Vision*. 17:647-657.
- Ward, B., E. Tarutta, and M. Mayer. 2009. The Efficacy and Safety of Posterior Pole Buckles in the Control of Progressive High Myopia. *Eye*. 23:2169–2174.
- Weng, W., B. Zhao, D. Lin, W. Gao, Z. Li, and H. Yan. 2016. Significance of Alpha Smooth Muscle Action Expression in Traumatic Painful Neuromas: A Pilot Study in Rats. *Nature*. 6:1-8.
- Wu, H., W. Chen, F. Zhao, Q.Zhou, P. Reinach, L. Deng, L. Ma, S.Lo, N.Srinivasalu, M. Pan, Y.Hu, X. Pei, J.Sun, R. Ren, Y. Xiong, Z.Zhou, S.Zhang, G.Tian, J. Fang, L. Zhang, J. Lang, D. Wu, C.Zeng, J. Qu, and X. Zhou. 2018. Scleral Hypoxia is a Target for Myopia Control. *PNAS*. 115(30):7091-7100.
- Wu, P., C. Tsai, G. Gordon, S. Jeong, T. Itakura, N. Patel, S. Shi, and M. Fini. 2015. Chondrogenesis in Scleral Stem/Progenitor cells and its Association with Form-Deprived Myopia in Mice. *Mol. Vis.* 21:138–147.
- Wu, P., H. Huang, H. Yu, P. Fang, and C. Chen. 2016. Epidemiology of Myopia. *Asia Pac. J. Ophthalmol.* 5: 386–393.
- Xiao, H., F. Zhong-Yi, and T. Dan. 2014. Comparison of Form- Deprived Myopia and Lens Induced Myopia In Guinea Pigs. *Int J. Ophtalmol.* 7 (2): 245-250.
- Yang, X., G. Hondur, M. Li, J. Ciai, J. Klein, M. Kuehn, and G. Tezel. 2015. Proteomics Analysis of Molecular Risk Factors in The Ocular Hypertensive Human Retina. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 56: 5816-6830.
- Yuan, J., S. Wu, Y. Wang, S. Pan, P. Wang, and L. Cheng. 2019. Inflammatory Cytokines in Highly Myopic Eyes. *Nature*. 3517:1-7.
- Zhang, Y., Z. Li, L. Liu, X. Han, X. Zhao, and G. Mu. 2013. Comparison of Riboflavin/ Ultraviolet-A Cross Linking in Porcine, Rabbit, and Human Sclera. *BioMed Research Int.* 4:10-15.

- Zhang X., J. Liu, B. Yu, F. Ma, X. Ren, and X. Li. 2018. Effects of Mesenchymal Stem Cells and Their Exosomes on the Healing of Large and Refractory Macular Holes. *Graefe's Archive for Clinical and Exp. Ophthalmol.* 2018. 256:2041-2052.
- Zhou, X., M. Pardue, M. Luvone, and J. Qu. 2017. Dopamine Signaling and Myopia Development: What are the Key Challenges. *Prog in Retinal and Eye Res.* 61:60-71.

LAMPIRAN

Lampiran 1

ORGANISASI PENELITIAN

Pembimbing I	: Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr. Sp.M(K)
Pembimbing II	: Ria Sandy Deneska, dr. Sp.M(K)
Pembimbing Patologi Anatomi	: Dyah Fauzia, dr. Sp.PA(K)
Konsultan Statistika	: Dr. Hari Basuki Notobroto, dr.M.Kes
Koordinator Penelitian	: Dr. Reni Prastyani, dr., SpM, MKes
Peneliti	: Muhammad Rizqy Abdullah
Pembantu Penelitian	: 1. Petugas laboratorium, Pusat Penelitian dan Pengembangan <i>Stem Cell</i> Universitas Airlangga 2. Petugas laboratorium Biokimia FK Unair 3. Petugas laboratorium Patologi Anatomi

Lampiran 2**ANGGARAN PENELITIAN**

No	Material	Harga
1.	Hewan Coba 24 Kelinci (@Rp. 500.000,-)	Rp. 12.000.000,-
2.	Anestesi Hewan Coba	Rp. 4.000.000,-
4.	Pemeliharaan dan sewa kandang	Rp. 4.000.000,-
5.	Reagen α -SMA	Rp. 5.200.000
6.	Pemeriksaan preparat	Rp. 3.600.000,-
7.	Sewa laboratorium pengolahan sel punca	Rp. 4.500.000
8.	Kultur sel punca	Rp. 7.500.000,-
9.	Fotokopi	Rp. 2.250.000
	TOTAL	Rp. 43.050.000,-

Lampiran 3. Sertifikat Kelaikan Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARENCE ”

No : 2.KE.077.08.2020

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

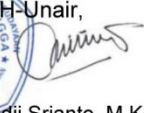
PENELITIAN BERJUDUL : Pengaruh Injeksi Intrasklara Sel Punca Mesenkimal Limbus Terhadap α -SMA dan Ketebalan Sklera pada Hewan Model *Forn Deprivation Myopia* (studi Experimental in Vivo pada *Oryctolagus cuniculus*)

PENELITI UTAMA : Muhammad Rizky Abdullah

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi Ilmu Kesehatan Mata
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Dr. Pudji Sianto, M.Kes., Drh.
NIP. 195601051986011001

Surabaya, 27 Agustus 2020

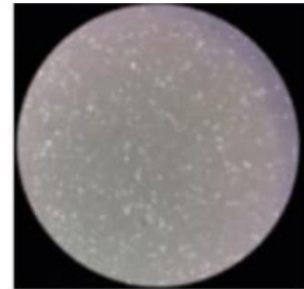
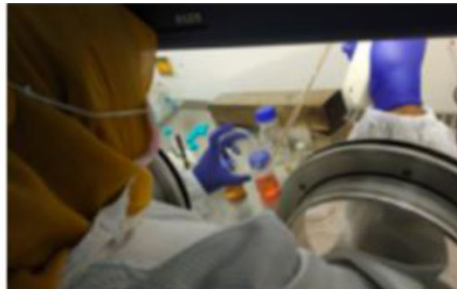
Ketua,



Dr. Nurdianto Triakoso, M.P., Drh.
NIP. 196805051997021001

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

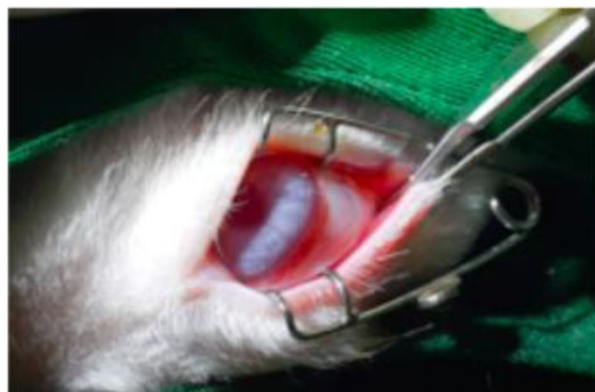
Kultur dan isolasi sel punca mesenkimal limbus



Induksi FDM dan pemeriksaan pada hewan coba



Injeksi sel punca mesenkimal limbus pada hewan model



Lampiran 5. Data Penelitian dan Analisis Statistik

Pemeriksaan Streak Retinoskopi dan *Axial Length* (AXL)

PEMERIKSAAN	STREAK RETINOSCOPY			AXL		
Kelompok	Minggu-0	Minggu-4	Minggu-6	Minggu-0	Minggu-4	Minggu-6
Kontrol	2	2	2	15.3	15.52	15.6
Kontrol	2	0	0	15.11	15.55	15.77
Kontrol	2	2	2	15.27	15.62	15.68
Kontrol	2	2	2	15.29	15.22	15.31
Kontrol	2	2	2	15.36	15.41	15.21
Kontrol	2	-1	-1	15.45	16.65	16.5
Kontrol	2	1	1	15.23	15.37	15.41
Kontrol	2	-1	-1	15.39	16.11	16.2
FDM	2	-0.5	-1	15.82	16.24	16.33
FDM	2	-1	-1	16.6	17.22	17.3
FDM	2	-1	-2	15.22	16.68	17
FDM	2	-2	-2	15.43	15.94	16.01
FDM	2	-2	-2	15.11	15.92	16
FDM	2	-1	-1	15.33	15.8	15.7
FDM	2	0	-1	15.75	16.01	16.22
FDM	2	0	-1	15.34	15.99	16.09
FDM SPML	2	1	1	15.11	15.85	15.9
FDM SPML	2	1	0	15.02	15.17	15.27
FDM SPML	2	0	0	15.31	16.87	16.72
FDM SPML	2	0	0	15.3	15.85	15.77
FDM SPML	2	0	1	15.21	15.57	15.33
FDM SPML	2	1	0	15.24	16.25	16.3
FDM SPML	2	-1	0	15.2	16.06	15.88
FDM SPML	2	0	1	15.32	15.65	15.54

KETEBALAN SKLERA

KELOMPOK	KETEBALAN SKLERA (μm)
KONTROL	248.13
KONTROL	184.29
KONTROL	187.74
KONTROL	227.14
KONTROL	212.84
KONTROL	174.76
KONTROL	427.80
KONTROL	171.47
FDM	213.76
FDM	198.12
FDM	265.95
FDM	276.24
FDM	221.15
FDM	268.03
FDM	173.88
FDM	349.44
FDM+SPML	250.83
FDM+SPML	274.39
FDM+SPML	294.38
FDM+SPML	270.00
FDM+SPML	251.87
FDM+SPML	287.66
FDM+SPML	407.72
FDM+SPML	310.12

EKSPRESI α -SMA (INTENSITAS DAN IRS SCORE)

KELOMPOK	INTENSITAS	IRS SCORE
KONTROL	3.00	12.00
KONTROL	2.00	8.00
KONTROL	2.00	8.00
KONTROL	2.00	8.00
KONTROL	3.00	12.00
KONTROL	2.00	8.00
KONTROL	2.00	8.00
KONTROL	2.00	8.00
FDM	2.00	8.00
FDM	3.00	12.00
FDM	3.00	12.00
FDM	3.00	12.00
FDM	1.00	4.00
FDM	3.00	12.00
FDM	3.00	12.00

FDM	3.00	12.00
FDM+SPML	2.00	8.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00
FDM+SPML	3.00	12.00

Axial Length

Case Processing Summary						
Cases						
	KELO MPOK	Valid		Missing		
		N	Percent	N	Percent	N
FDM MINGGU KE-0	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM MINGGU KE-4	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM MINGGU KE-6	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM SPML MINGGU KE-0	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM SPML MINGGU KE-4	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM SPML MINGGU KE-6	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
Kontrol Minggu ke-0	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
Kontrol Minggu ke-4	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
Kontrol Minggu ke-6	OD	8	100,0%	0	0,0%	8

Tests of Normality							
	KELOMP OK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
FDM MINGGU KE-0	OD	,243	8	,180	,845	8	,085
FDM MINGGU KE-4	OD	,296	8	,038	,804	8	,032
FDM MINGGU KE-6	OD	,251	8	,147	,879	8	,182
FDM SPML MINGGU KE-0	OD	,198	8	,200*	,903	8	,306
FDM SPML MINGGU KE-4	OD	,171	8	,200*	,963	8	,835
FDM SPML MINGGU KE-6	OD	,200	8	,200*	,940	8	,612
Kontrol Minggu ke-0	OD	,137	8	,200*	,976	8	,938
Kontrol Minggu ke-4	OD	,302	8	,031	,834	8	,065
Kontrol Minggu ke-6	OD	,196	8	,200*	,924	8	,464

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

a. Lilliefors Significance Correction

Deskriptif Statistik

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	25th	Percentiles 50th (Median)	75th
Kontrol Minggu ke-0	8	15,3000	,10433	15,11	15,45	15,2400	15,2950	15,3825
Kontrol Minggu ke-4	8	15,6813	,47094	15,22	16,65	15,3800	15,5350	15,9875
Kontrol Minggu ke-6	8	15,7100	,44414	15,21	16,50	15,3350	15,6400	16,0925

Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
Kontrol Minggu ke-0	1,25
Kontrol Minggu ke-4	2,13
Kontrol Minggu ke-6	2,63

Test Statistics^a

N	8
Chi-Square	7,750
df	2
Asymp. Sig.	,021

a. Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
FDM MINGGU KE-0	1,00
FDM MINGGU KE-4	2,13
FDM MINGGU KE-6	2,88

Test Statistics^a

N	8
Chi-Square	14,250
df	2
Asymp. Sig.	,001

a. Friedman Test

Friedman Test

Ranks	
	Mean Rank
FDM SPML MINGGU KE-0	1,00
FDM SPML MINGGU KE-4	2,63
FDM SPML MINGGU KE-6	2,38

Test Statistics^a	
N	8
Chi-Square	12,250
df	2
Asymp. Sig.	,002

a. Friedman Test

Kruskal Wallis AXL

Ranks			
	axial	N	Mean Rank
minggu0	Kontrol	8	12.81
	FDM	8	16.50
	FDM+SPML	8	8.19
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

minggu0	
Kruskal-Wallis H	5.563
df	2
Asymp. Sig.	.062

a. Kruskal Wallis Test

Ranks

	axial	N	Mean Rank
minggu4	Kontrol	8	8.38
	FDM	8	16.63
	FDM+SPML	8	12.50
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

minggu4	
Kruskal-Wallis H	5.447
df	2
Asymp. Sig.	.066

a. Kruskal Wallis Test

Ranks

	axial	N	Mean Rank
minggu6	Kontrol	8	9.06
	FDM	8	17.38
	FDM+SPML	8	11.06
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

minggu6	
Kruskal-Wallis H	6.026
df	2
Asymp. Sig.	.049

a. Kruskal Wallis Test

Analisis STREAK

	KELOMPOK	Valid		Cases Missing		Total N
		N	Percent	N	Percent	
FDM MINGGU KE-0	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM MINGGU KE-4	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM MINGGU KE-6	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM SPML MINGGU KE-0	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM SPML MINGGU KE-4	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
FDM SPML MINGGU KE-6	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
Kontrol Minggu ke-0	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
Kontrol Minggu ke-4	OD	8	100,0%	0	0,0%	8
Kontrol Minggu ke-6	OD	8	100,0%	0	0,0%	8

Friedman Test**Ranks**

	Mean Rank
Kontrol Minggu ke-0	2,50
Kontrol Minggu ke-4	1,75
Kontrol Minggu ke-6	1,75

Test Statistics^a

N	8
Chi-Square	8,000
df	2
Asymp. Sig.	,018

a. Friedman Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
minggu0	Kontrol	8	12.50
	FDM	8	12.50
	FDM+SPML	8	12.50
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

minggu0	
Kruskal-Wallis H	.000
df	2
Asymp. Sig.	1.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
minggu6	Kontrol	8	17.00
	FDM	8	5.13
	FDM+SPML	8	15.38
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

minggu6	
Kruskal-Wallis H	13.963
df	2
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
minggu4	Kontrol	8	16.56
	FDM	8	6.81
	FDM+SPML	8	14.13
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

minggu4	
Kruskal-Wallis H	8.660
df	2
Asymp. Sig.	.013

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

ANALISIS KETEBALAN SKLERA

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
AK	.287	8	.052	.700	8	.002
AP	.171	8	.200*	.944	8	.653
SC	.245	8	.173	.786	8	.020

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

Test Statistics^{a,b}

KETEBALAN	
Kruskal-Wallis H	7.355
df	2
Asymp. Sig.	.025

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
KELOMPOK

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
KETEBALAN	24	256.1546	68.30161	171.47	427.80
KELOMPOK	24	2.0000	.83406	1.00	3.00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank
KETEBALAN	KONTROL	8	8.13
	FDM	8	11.75
	FDM+SPML	8	17.63
	Total	24	

MANN WHITNEY

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
KETEBALAN	KONTROL	8	8.50	68.00
	FDM	8	8.50	68.00
	Total	16		

Test Statistics^a

KETEBALAN	
Mann-Whitney U	32.000
Wilcoxon W	68.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: KELOMPOK

b. Not corrected for ties.

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
KETEBALAN	KONTROL	8	5.50	44.00
	FDM+SPML	8	11.50	92.00
	Total	16		

Test Statistics^a

KETEBALAN

Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	44.000
Z	-2.521
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

a. Grouping Variable: KELOMPOK

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
KETEBALAN	FDM	8	5.50	44.00
	FDM+SPML	8	11.50	92.00
	Total	16		

Test Statistics^a

KETEBALAN

Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	44.000
Z	-2.521
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

a. Grouping Variable: KELOMPOK

ANALISIS INTENSITAS α -SMA

Tests of Normality							
Double-click to activate		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IRS	KONTROL	.455	8	.000	.566	8	.000
	FDM	.443	8	.000	.601	8	.000
	FDM+SC	.513	8	.000	.418	8	.000
INTENSITAS	KONTROL	.455	8	.000	.566	8	.000
	FDM	.443	8	.000	.601	8	.000
	FDM+SC	.513	8	.000	.418	8	.000
a. Lilliefors Significance Correction							

Case Processing Summary

KELOMPOK		Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
IRS	KONTROL	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	FDM	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	FDM+SC	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
INTENSITAS	KONTROL	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	FDM	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	FDM+SC	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%

Ranks

KELOMPOK		N	Mean Rank
IRS	KONTROL	8	8.38
	FDM	8	13.56
	FDM+SC	8	15.56
	Total	24	
INTENSITAS	KONTROL	8	8.38
	FDM	8	13.56
	FDM+SC	8	15.56
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	IRS	INTENSITAS
Kruskal-Wallis H	6.116	6.116
df	2	2
Asymp. Sig.	.047	.047

a. Kruskal Wallis Test

Ranks				
	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTENSITAS	KONTROL	8	6.88	55.00
	FDM	8	10.13	81.00
	Total	16		
IRS	KONTROL	8	6.88	55.00
	FDM	8	10.13	81.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	INTENSITAS	IRS
Mann-Whitney U	19.000	19.000
Wilcoxon W	55.000	55.000
Z	-1.532	-1.532
Asymp. Sig. (2-tailed)	.126	.126
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.195 ^b	.195 ^b

a. Grouping Variable: KELOMPOK

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTENSITAS	KONTROL	8	6.00	48.00
	FDM+SC	8	11.00	88.00
	Total	16		
IRS	KONTROL	8	6.00	48.00
	FDM+SC	8	11.00	88.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	INTENSITAS	IRS
Mann-Whitney U	12.000	12.000
Wilcoxon W	48.000	48.000
Z	-2.440	-2.440
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.038 ^b	.038 ^b

a. Grouping Variable: KELOMPOK

Mann-Whitney Test

Ranks				
	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
INTENSITAS	FDM	8	7.94	63.50
	FDM+SC	8	9.06	72.50
	Total	16		
IRS	FDM	8	7.94	63.50
	FDM+SC	8	9.06	72.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	INTENSITAS	IRS
Mann-Whitney U	27.500	27.500
Wilcoxon W	63.500	63.500
Z	-.694	-.694
Asymp. Sig. (2-tailed)	.487	.487
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.645 ^b	.645 ^b

a. Grouping Variable: KELOMPOK

Lampiran 6. Tabel *Immunoreactive Score* (IRS)

<i>Percentage of positive cells X Intensity of Staining = Score (0 – 12)</i>		
0 = no positive cells	0 = no color reaction	0 – 1 = negative
1 = < 10% of positive cells	1 = mild reaction	2 – 3 = mild
2 = 10-50% positive cells	2 = moderate reaction	4 – 8 = moderate
3 = 51-80% positive cells	3 = intense reaction	9 – 12 = strongly positive
4 = > 80% positive cells		