

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN MEMBRAN *PLATELET RICH FIBRIN*
TERHADAP EKSPRESI *ALPHA SMOOTH MUSCLE ACTIN* DAN
TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA PADA KERATITIS
Pseudomonas aeruginosa (STUDI EKSPERIMENTAL PADA
ORYCTALOGUS CUNICULUS)**



Oleh:

Bimanda Rizki Nurhidayat
NIM. 012015653101

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN MEMBRAN *PLATELET RICH FIBRIN*
TERHADAP EKSPRESI *ALPHA SMOOTH MUSCLE ACTIN* DAN
TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA PADA KERATITIS
Pseudomonas aeruginosa (STUDI EKSPERIMENTAL PADA
ORYCTALOGUS CUNICULUS)**

Oleh:
Bimanda Rizki Nurhidayat, dr.

NIM:
012015653101

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN MEMBRAN *PLATELET RICH FIBRIN*
TERHADAP EKSPRESI *ALPHA SMOOTH MUSCLE ACTIN* DAN
TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA PADA KERATITIS
Pseudomonas aeruginosa (STUDI EKSPERIMENTAL PADA
ORYCTALOGUS CUNICULUS)**

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelas Magister Kedokteran Klinik
(M. Ked. Klin)
Program Studi Ilmu Kesehatan Mata
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:
Bimanda Rizki Nurhidayat, dr.

NIM:
012015653101

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

Menyetujui tesis yang berjudul:

Pengaruh Pemberian Membran *Platelet Rich Fibrin* Terhadap Ekspresi *Alpha Smooth Muscle Actin* Dan *Transforming Growth Factor Beta* Pada Keratitis *Pseudomonas aeruginosa* (Studi Eksperimental Pada *Oryctolagus Cuniculus*)

Akan dipresentasikan dan diteruskan menjadi suatu penelitian oleh:

dr. Bimanda Rizki Nurhidayat

Pembimbing 1



Dr. Nurwasis, dr., Sp.M (K)

NIP. 19580619 198611 1 001

Pembimbing 2



Dr. Evelyn Komaratih, dr., Sp.M (K)

NIP. 19680110 199703 2 003

Mengetahui,

Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik

Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp.A(K)

NIP. 19650227 199003 1 010

HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI TESIS

Laporan tesis ini diajukan oleh:

Nama : dr. Bimanda Rizki Nurhidayat
NIM : 012015653101
Program Studi : Ilmu Kesehatan Mata
Judul : Pengaruh Pemberian Membran *Platelet Rich Fibrin*
Terhadap Ekspresi *Alpha Smooth Muscle Actin* Dan
Transforming Growth Factor Beta Pada Keratitis
Pseudomonas aeruginosa (Studi Eksperimental Pada
Oryctolagus Cuniculus)

Laporan Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji
Program Studi Ilmu Kesehatan Mata Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo
Pada Kamis, 06 Oktober 2022

Panitia Penguji:

1. Ketua Penguji : Dr. Ismi Zuhria, dr., Sp.M(K)
2. Penguji : Dr. Nurwasis, dr., Sp.M(K)
3. Penguji : Dr. Evelyn Komaratih, dr., Sp.M(K)
4. Penguji : Dr. Wimbo Sasono, dr., Sp.M(K)
5. Penguji : Dr. Diah Indriani., SSi., Msi.

PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS

Yang bertandatangan di bawah ini

Nama : dr. Bimanda Rizki Nurhidayat

NIM : 011728016304

Program Studi : Ilmu Kesehatan Mata

Angkatan : Januari 2018

Jenjang : PPDS

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan kegiatan plagiat dalam penulisan Tesis saya yang berjudul:

Pengaruh Pemberian Membran *Platelet Rich Fibrin* Terhadap Ekspresi *Alpha Smooth Muscle Actin* Dan *Transforming Growth Factor Beta* Pada Keratitis *Pseudomonas aeruginosa* (Studi Eksperimental Pada *Oryctolagus Cuniculus*)

Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 01 September 2022
Penulis



dr. Bimanda Rizki N.
NIM. 012015653101

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT dengan selesainya Tesis dengan judul ***Pengaruh Pemberian Membran Platelet Rich Fibrin Terhadap Ekspresi Alpha Smooth Muscle Actin Dan Transforming Growth Factor Beta Pada Keratitis Pseudomonas aeruginosa (Studi Eksperimental Pada Oryctalogus Cuniculus).***

Dalam penyelesaian laporan penelitian ini, penulis mendapatkan banyak bantuan, bimbingan, masukan, serta dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menghaturkan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada yang terhormat:

1. **Dr. Nurwasis dr., Sp.M(K)** sebagai pembimbing I yang selalu memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi serta referensi dan koreksi dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
2. **Dr. Evelyn Komaratih, dr., Sp.M(K)** sebagai pembimbing II dan Kepala Departemen/KSM Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo yang selalu memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi serta referensi dan koreksi dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
3. **Djoko Legowo, drh., M.Kes** sebagai konsultan Patologi Anatomi yang telah memberikan bimbingan dan konsep penelitian dalam penyusunan usulan penelitian ini.

4. **Dr. Diah Indriani, SSi. MSi** sebagai konsultan Statistika yang telah memberikan bimbingan mengenai statistika dan konsep penelitian dalam penyusunan usulan penelitian ini.
5. **Yulia Primitasari, dr., SpM(K)** sebagai Koordinator Program Studi Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang telah memberikan semangat dan kesempatan untuk ditampilkannya laporan hasil penelitian ini.
6. **Dr. Luki Indriaswati, dr., SpM(K)** selaku koordinator penelitian yang telah memberikan motivasi dan arahan dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini.
7. **Indri Wahyuni, dr., Sp.M(K)** sebagai pembimbing akademik yang selalu memberikan motivasi dalam penyusunan penelitian ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
8. **Para Guru Besar dan seluruh staf pengajar** Departemen/KSM Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang memberikan saran dan motivasi selama penyusunan laporan hasil penelitian ini.
9. **Nandang Sudrajat, dr. dan Oggy Satriya Putra, dr.,** yang telah berjuang bersama, memberikan dorongan dan semangat hingga terselesaikannya penelitian ini.
10. **Teman-teman sejawat PPDS I** Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah memberikan bantuan dan dorongan semangat dalam penyusunan penelitian ini.

11. **Bapak/Ibu moderator dan sekretaris sidang**, yang telah memimpin jalannya presentasi hasil penelitian ini.
12. **Tim Audiovisual** yang telah memberikan bantuan dalam presentasi hasil penelitian ini.
13. **Tim sekretariat PPDS I** Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
14. **Orang tua dan mertua saya, istri saya tercinta dr.Novyta Devi Yulian, serta anak-anak saya Almaeera Biandra Maheswari dan Gendhis Aruna Shareefah**
15. **Semua pihak** yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu atas semua bantuannya sehingga terselesaikannya laporan usulan penelitian ini, tidak lupa kami haturkan banyak terima kasih. Semoga amal baiknya diberikan balasan yang setimpal dan selalu mendapatkan berkah dan rahmat dari Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa.

Surabaya, 01 September 2022

Penulis

dr. Bimanda Rizki N.
NIM. 012015653101

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Membran *Platelet Rich Fibrin* Terhadap Ekspresi *Alpha Smooth Muscle Actin* Dan *Transforming Growth Factor Beta* Pada Keratitis *Pseudomonas aeruginosa* (Studi Eksperimental Pada *Oryctolagus Cuniculus*)

Bimanda Rizki Nurhidayat, Nurwasis, Evelyn Komaratih, Djoko Legowo, Diah Indriani, Nandang Sudrajat, Oggy Satriya Putra

Keratitis merupakan peradangan kornea dari berbagai penyebab dan manifestasi klinis, karena gangguan mekanisme pertahanan yang disebabkan oleh cedera atau defek epitel kecil, berbagai jenis patogen atau pengaruh lingkungan dapat menyebabkan peradangan kornea. Mikroba penyebab tersering antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptokokus Pyogenes*. Interaksi yang kompleks antara bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan inang, bakteri ini memiliki kemampuan khas yaitu memicu respon imun yang hebat dan menyebabkan kerusakan jaringan lokal. Fibrosis dapat terbentuk dan menyebabkan kehilangan penglihatan, serta pada kasus yang berat dapat menyebabkan perforasi kornea atau menyebar ke jaringan sekitarnya. Kekeruhan kornea adalah penyebab kebutaan kelima di dunia, dengan prevalensi sebesar 3,2% pada kasus yang dilaporkan. Organisasi WHO melaporkan bahwa 6 juta populasi dunia yang mengalami kebutaan disebabkan karena penyakit kornea. Diantara semua etiologi seperti infeksi, trauma, peradangan, degenerasi, dan kekurangan gizi, kasus keratitis infeksi merupakan penyebab utama kebutaan kornea di negara maju dan negara berkembang, dengan perkiraan kasus sebesar 2,5-799 per 100.000 penduduk per tahun. Pada studi di India, dilaporkan 57,52% kasus kekeruhan kornea disebabkan karena keratitis infeksi dengan lokasi kekeruhan kornea tersering di area sentral sebesar 49,35% dan sikatrik kornea berupa nebula sebesar 42,85%.

Tujuan perawatan medis keratitis adalah untuk mengobati infeksi dan mencegah komplikasi seperti perforasi kornea, kemudian membantu proses reepitelisasi dengan manajemen awal pengobatan menggunakan terapi medikamentosa, dan jika tidak responsif maka dilanjutkan dengan intervensi bedah. Membran *Platelet-rich fibrin* (PRF) adalah generasi kedua konsentrat platelet yang dikembangkan pertama kali oleh Choukroun *et al* dari Perancis yang digunakan di bidang oral dan maksilofasial. Membran PRF banyak mengandung matriks protein serta faktor pertumbuhan yang penting dalam membantu proses penyembuhan luka seperti *platelet-derived growth factors* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *transforming growth factor* (TGF- β) yang dilepaskan bertahap selama 7 hingga 28 hari. Matriks fibrin yang merupakan gabungan dari trombosit terkonsentrasi, *growth factor*, sitokin, circulating stem cell, dan sedikit leukosit akan memiliki peran kemotaktik dalam penyembuhan luka. Selain itu, membran PRF juga memberikan fungsi mekanis sebagai kerangka tempat proliferasi, diferensiasi dan migrasi sel yang penting untuk regenerasi jaringan. Kombinasi fungsi mekanis dan kemotaktik dari membran PRF membuatnya cocok

sebagai biomaterial *autologous* untuk rekonstruksi, perbaikan, dan pemeliharaan permukaan okuli.

Sampel sejumlah 12 kelinci putih New Zealand (*Oryctalogus cuniculus*) dilakukan induksi keratitis dengan inokulasi *Pseudomonas aeruginosa*. Dua hari setelah dilakukan induksi keratitis, kelinci dibagi menjadi dua kelompok dengan masing-masing kelompok sebanyak 6 kelinci. Kelompok pertama adalah kelinci yang diberi terapi antibiotik saja, sedangkan kelompok kedua adalah kelinci yang diberi terapi antibiotik dan membran *Platelet Rich Fibrin* (PRF). Ekspresi α -SMA dan TGF- β pada lapisan epitel, stroma dan endotel kornea dievaluasi dengan pemeriksaan imunohistokimia pada hari ke-10 setelah induksi keratitis.

Berdasarkan uji statistik apabila data berdistribusi normal menggunakan *independent t test* atau jika data tidak berdistribusi normal menggunakan *Mann-Whitney test*, hasil ekspresi α -SMA menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi α -SMA pada lapisan endotel kornea antara kelompok antibiotik dengan kelompok antibiotik + membran PRF dengan hasil $p=0,028$. Sedangkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok pada lapisan epitel ($p=0,079$) dan lapisan stroma ($p=0,080$). Hasil rerata ekspresi α -SMA di lapisan endotel kornea pada kelompok K1 adalah 2,90 dan pada kelompok K2 adalah 0,97, sehingga menunjukkan rerata ekspresi α -SMA pada kelompok antibiotik + membran PRF lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja.

Hasil ekspresi TGF- β menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi TGF- β di lapisan epitel kornea antara kelompok antibiotik (K1) dengan kelompok antibiotik + membran PRF (K2) dengan hasil $p=0,003$. Sedangkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok pada lapisan stroma ($p=0,440$) dan lapisan endotel ($p=0,740$). Hasil rerata ekspresi TGF- β di lapisan epitel kornea pada kelompok K1 adalah 2,60 dan pada kelompok K2 adalah 0,27, sehingga menunjukkan rerata ekspresi TGF- β pada kelompok antibiotik + membran PRF lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa membran PRF dapat menurunkan ekspresi α -SMA dan TGF- β di hari ke-10 pada kornea hewan model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.

SUMMARY

The Effect Of Rich Fibrin Platelet Membrane On Expression Of Alpha Smooth Muscle Actin and Transforming Growth Factor Beta In *Pseudomonas Aeruginosa* Keratitis (Experimental Study In *Oryctolagus Cuniculus*)

Bimanda Rizki Nurhidayat, Nurwasis, Evelyn Komaratih, Djoko Legowo, Diah Indriani, Nandang Sudrajat, Oggy Satriya Putra

Keratitis is a knowledge of a variety of causes and minor manifestations because impaired defense mechanisms caused by defects of various kinds, types, or environmental influences can cause inflammation. The most common causative microbes include *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes*. The complex between the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and its host, this bacterium has the unique ability to trigger intense immune interactions and cause local tissue damage. Scar tissue can form and cause vision loss, and in severe cases, it can perforate or spread to surrounding tissue. Turbidity is the fifth leading cause of blindness in the world, with a prevalence of 3.2% in reported cases. The WHO organization reports that 6 million of the world's population are blind due to disease. Among all etiologies of infection, trauma, inflammation, degeneration, and malnutrition, infectious keratitis is the leading cause of blindness in developed and developing countries, with an estimated 2.5-799 cases per 100,000 population per year. In a study in India, it was reported that 57.52% of other opacities were caused by infectious keratitis, with the most common location being in the area of 49.35% and nebula-like cicatricial at 2.85%. The goals of treatment for keratitis are to eradicate infectious microbes, improve the integrity of the ocular surface and the clarity of the cornea. Unfortunately, treatment for tissue regeneration caused by infective keratitis was still ineffective. Current routine treatment has certain clinical limitations. Platelet-rich fibrin (PRF) as a source of growth factor has been widely used in various therapeutic fields so that it can accelerate the wound healing process. One of the studies on the use of PRF in cases of corneal opacification due to infective keratitis showed that the application of PRF could reduce the inflammatory reaction and neovascularization formation so PRF was expected to be used for ocular surface reconstruction.

The goal of medical treatment of keratitis is for infection and complications such as perforation of initial treatment, then assisting the reepithelialization process with treatment management using medical therapy, and if not, proceeding with surgical intervention. Platelet-rich fibrin membrane (PRF) is a second-generation platelet concentrate developed by Choukroun et al. from France for use in the oral and maxillofacial fields. The PRF membrane contains a lot of matrix proteins and growth factors that are important in helping the wound healing process, such as platelet-derived growth factors (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and transforming growth factor (TGF- β), which run gradually for 7 to 28 days. Fibrin matrix which is a

combination of platelet concentration, growth factors, cytokines, circulating stem cells, and few leukocytes will have a chemotactic role in wound healing. In addition, the PRF membrane also serves as a framework for cell proliferation, differentiation, and migration which is important for tissue regeneration. The mechanical and chemotactic functions of PRF membranes make them suitable as autologous biomaterials for the reconstruction, repair, and maintenance of ocular surfaces.

A sample of 12 New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) was subjected to keratitis induction by inoculation of *Pseudomonas aeruginosa*. Two days after the induction of keratitis, the rabbits were divided into two groups, with six rabbits in each group. The first group was rabbits treated with antibiotics alone, while the second group was rabbits treated with antibiotics and Platelet Rich Fibrin (PRF) grafts. The expression of α -SMA and TGF- β in the epithelial, stromal, and endothelial layers had an immunohistochemical examination on day ten after keratitis induction.

Based on the statistical test if the data were normally distributed using the independent t-test or if the data were not normally distributed using the Mann-Whitney test, the results of α -SMA expression showed a significant difference in the expression of α -SMA in the endothelial layer between the antibiotic group and the antibiotic group + PRF membrane with results $p=0.029$. Meanwhile, there was no significant difference between groups in the epithelial layer ($p=0.079$) and the stromal layer ($p=0.080$). The mean result of α -SMA expression in the endothelial layer of the group in the K1 group was 2.90 and in the K2 group was 0.97, indicating that the mean α -SMA expression in the antibiotic+graft PRF group was less than the antibiotic alone group.

The results of TGF- β expression showed significant differences in TGF- β in the epithelial layer of expression between the antibiotic group (K1) and the antibiotic group+PRF membrane (K2) with $p=0.003$. Meanwhile, there was no significant difference between groups in the stromal layer ($p=0.440$) and the endothelial layer ($p=0.740$). The average TGF- expression in the more epithelial layer in the K1 group, was 2.60 and in the K2 group was 0.27, indicating the mean TGF- β expression in the antibiotic+PRF graft group compared to the antibiotic alone group.

The conclusion from the results of this study was that the PRF membrane could reduce the expression of α -SMA and TGF- β on day 10 in animal models of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis.

ABSTRAK

Pengaruh Pemberian Membran *Platelet Rich Fibrin* Terhadap Ekspresi *Alpha Smooth Muscle Actin* Dan *Transforming Growth Factor Beta* Pada Keratitis *Pseudomonas aeruginosa* (Studi Eksperimental Pada *Oryctolagus Cuniculus*)

Bimanda Rizki Nurhidayat, Nurwasis, Evelyn Komaratih, Djoko Legowo, Diah Indriani, Nandang Sudrajat, Oggy Satriya Putra

Latar Belakang: Salah satu jenis keratitis mikroba yang paling umum adalah keratitis bakteri. Penyebab paling sering adalah *Pseudomonas aeruginosa*, yang muncul lebih parah, dan menyebabkan kerusakan jaringan lokal. Fibrosis dapat terbentuk dan menyebabkan kehilangan penglihatan, dan perforasi kornea serta menyebar ke jaringan sekitarnya pada kasus yang berat.

Metode: *Pseudomonas aeruginosa* disuntikkan ke dalam kornea 10 ekor kelinci secara intrastromal dan dibagi menjadi 2 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor kelinci, kelinci dengan keratitis bakterial diberikan levofloxacin sebagai kelompok 1 dan kelinci dengan keratitis bakterial diberikan levofloxacin dan membran *Platelet Rich Fibrin* (PRF) sebagai kelompok 2. Levofloxacin diberikan dua hari setelah induksi dan pembentukan keratitis. Pada hari ke 10 mata dilakukan enukleasi untuk mengetahui pengaruh PRF terhadap ekspresi TGF- β dan α -SMA pada kornea dengan pemeriksaan pewarnaan imunohistokimia (IHC). Data ekspresi TGF- β dan α -SMA dianalisis menggunakan uji-t independen dan Mann Whitney untuk membandingkan kelompok karena hasil analisis signifikan.

Hasil: Terdapat perbedaan ekspresi α -SMA yang bermakna antara kelompok 1 dan kelompok 2 pada lapisan endotel, dengan $p=0,028$. Hasil ekspresi TGF- β menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok 1 dan kelompok 2 pada lapisan epitel, dengan hasil = 0,003.

Kesimpulan: Membran PRF menurunkan ekspresi α -SMA pada endotel kornea dan TGF- β pada epitel kornea model hewan keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.

Kata kunci: Keratitis Bakteri, *Pseudomonas aeruginosa*, PRF, α -SMA dan TGF- β

ABSTRACT

The Effect Of Rich Fibrin Platelet Membrane On Expression Of Alpha Smooth Muscle Actin and Transforming Growth Factor Beta In *Pseudomonas Aeruginosa* Keratitis (Experimental Study In *Oryctalogus Cuniculus*)

Bimanda Rizki Nurhidayat, Nurwasis, Evelyn Komaratih, Djoko Legowo, Diah Indriani, Nandang Sudrajat, Oggy Satriya Putra

Background: One of the most common types of microbial keratitis is bacterial keratitis. The most common cause is *Pseudomonas aeruginosa*, which is more severe and causes local tissue damage. Fibrosis can form and cause vision loss, and perforation and spread to surrounding tissues in severe cases.

Methods: *Pseudomonas aeruginosa* was injected into the corneas of 10 rabbits intrastromal and divided into 2 groups, with each group consisting of 5 rabbits, rabbits with bacterial keratitis given levofloxacin as a group 1 and rabbits with bacterial keratitis given levofloxacin and Rich Fibrin Platelet (PRF) membrane as a group 2. Levofloxacin was given two days after the induction and the formation of keratitis. On day 10, the eyes were enucleation, to determine the effect of PRF on TGF- β and α -SMA expression in the cornea with an immunohistochemistry (IHC) staining examination. The TGF- β and α -SMA expression data were analyzed using an independent t-test and Mann Whitney to compare groups due to the analysis results being significant.

Results: There was a significant difference in the expression of α -SMA between group 1 and group 2 in the endothelium layer, with $p=0.028$. There was a significant difference in the expression of TGF- β between group 1 and group 2 in the epithelial layer, with a result of $= 0.003$.

Conclusion: PRF membrane decreased α -SMA expression in the corneal endothelium and TGF- β in the corneal epithelium of animal models of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis.

Keywords: Bacterial Keratitis, *Pseudomonas aeruginosa*, PRF, α -SMA and TGF- β

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI TESIS	v
PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4. Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Teoritis	7
1.4.2 Manfaat Praktis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Anatomi dan Fisiologi Kornea	8
2.2 Keratitis Bakteri	12
2.3 Patogenesis Keratitis Bakterialis	14
2.4 Peranan Sitokin dan Faktor Pertumbuhan pada Keratitis Bakterialis	17
2.5 Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA)	22
2.6 Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)	25
2.7 Penatalaksanaan Keratitis Bakterialis	30
2.7.1 Sianoakrilat	30
2.7.2 Transplantasi Membran Amnion	31
2.7.3 Inhibitor Matrix Metalloproteinase	33
2.7.4 Krioterapi	34
2.7.5 Conjunctival Flap	35
2.8 Potensi Membran Platelet-Rich Fibrin pada Keratitis Bakterialis	36
2.9 Kelinci Putih New Zealand (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	48

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	51
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	52
3.3 Hipotesis Penelitian	54
BAB 4 METODE PENELITIAN	55
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	55
4.1.1. Jenis Penelitian	55
4.1.2. Rancangan Penelitian	55
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	58
4.3. Sampel Penelitian dan Replikasi	58
4.3.1. Sampel Penelitian	58
4.3.2. Replikasi	58
4.4 Kriteria Unit Eksperimen	59
4.4.1 Kriteria Inklusi	59
4.4.2 Kriteria Eksklusi	59
4.4.3 Kriteria Putus Uji	60
4.5 Variabel Penelitian	60
4.5.1 Variabel Bebas	60
4.5.2 Variabel Tergantung	60
4.6 Definisi Operasional	60
4.7 Instrumen Penelitian	61
4.7.1 Sarana Penelitian	61
4.7.2 Alat dan Bahan Penelitian	62
4.8 Protokol Penelitian	63
4.9 Cara Kerja Penelitian	64
4.9.1 Persiapan dan Produksi Membran Platelet-Rich Fibrin	65
4.9.2 Penjahitan Membran PRF	66
4.9.3 Pemeriksaan Imunohistokimia α -SMA dan TGF- β	66
4.10 Manajemen dan Analisis Data	69
4.10.1 Analisis Deskriptif	69
4.10.2 Analisis Inferensial	69
4.11 Etika Penelitian	69
BAB 5 HASIL PENELITIAN	70
5.1 Karakteristik Sampel Penelitian	70
5.2 Ekspresi α -SMA	73
5.3 Ekspresi TGF- β	76
BAB 6 PEMBAHASAN	81
6.1 Karakteristik Sampel Penelitian	83
6.2 Pengaruh PRF terhadap ekspresi α -SMA	87
6.3 Pengaruh PRF terhadap ekspresi TGF- β	93
6.4 Keterbatasan Penelitian	98
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	99
7.1 Kesimpulan	99

7.2 Saran	99
BAB 8 Penutup	101
DAFTAR PUSTAKA	102



DAFTAR TABEL

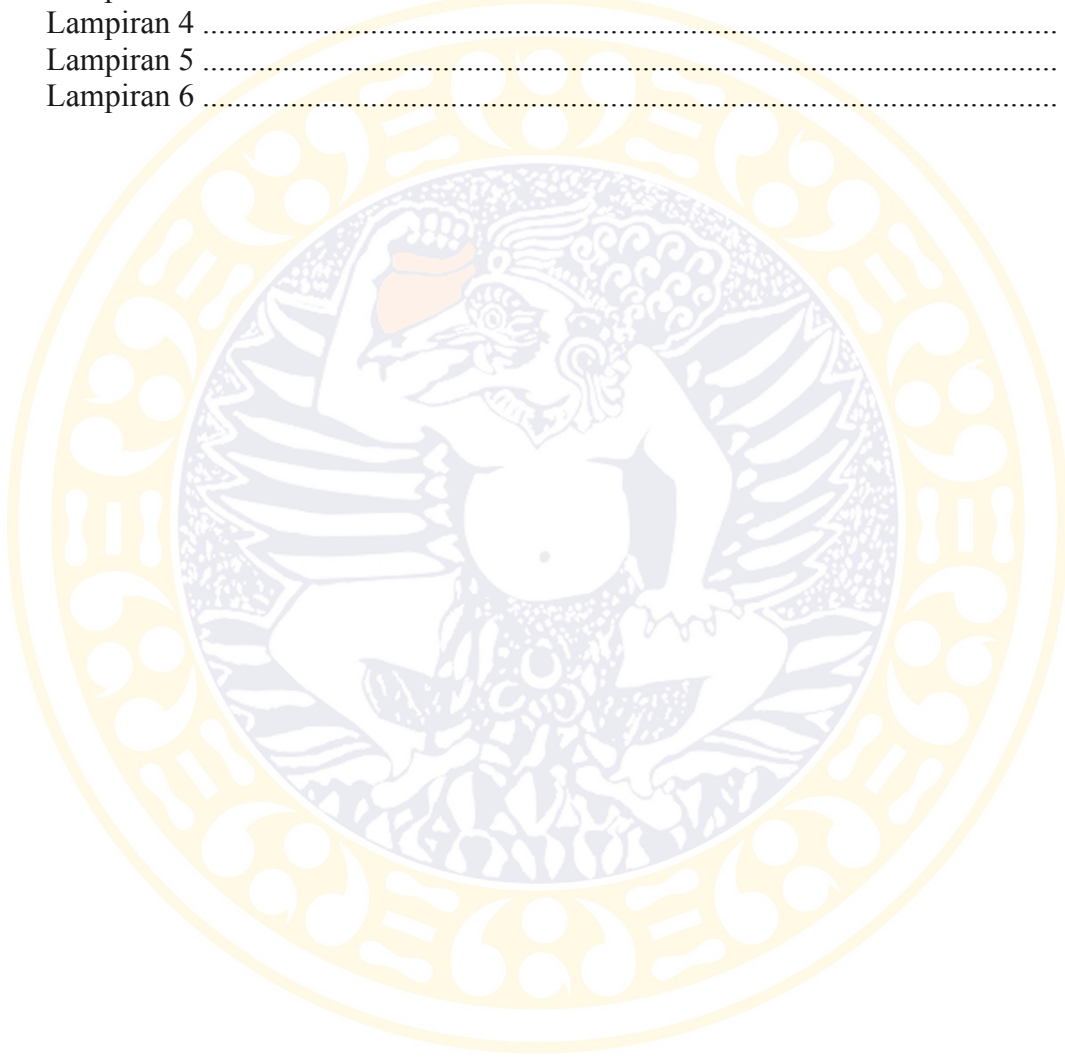
	Halaman
Tabel 2.1 Fase-Fase Infeksi Kornea Oleh Bakteri	18
Tabel 2.2 Kelebihan Dan Kekurangan PRF	40
Tabel 2.3 Beberapa Faktor Pertumbuhan Dan Sitokin Yang Terdapat Di Dalam PRF Beserta Fungsinya	43
Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel	60
Tabel 4.2 Skala Semikuantitatif IRS Untuk Penilaian Ekspresi α -SMA dan TGF- β . ..	68
Tabel 5.1 Distribusi Kadar Trombosit Dan Fibrinogen Kelinci	71
Tabel 5.2 Rerata Ekspresi α -SMA	74
Tabel 5.3 Rerata Ekspresi TGF- β Pada Kornea	77
Tabel 5.4 Rerata Ekspresi TGF- β Pada Lapisan Epitel, Stroma Dan Endotel	78

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Anatomi Kornea (Susan Stadring; Henry Gray, 2008)	9
Gambar 2.2 Jalur Degradasi Kolagen Yang Dimediasi Oleh Fibroblas Kornea (Nishida Et Al., 2021).....	21
Gambar 2.3 Diagram Skematik Dari Proses Penyembuhan Luka Kornea Yang Dimediasi Oleh TGF- β : (A) Cedera Pada Kornea Mengakibatkan Sitokin, TGF- β Dan PDGF Sel Keratosit Berdiferensiasi Menjadi Myofibroblast, (B) Proses Penyembuhan Lesi Kornea Selesai Kemudian Sel-Sel Myofibroblas Mengalami Apoptosis, (C) Sel-Sel Myofibroblas Melakukan Remodeling Matriks Ekstraseluler Dan Muncul Neovaskularisasi (Rocher Et Al., 2020).....	29
Gambar 2.4 Proses Pembuatan PRF; A. Alat Untuk Proses Sentrifugasi; B. Proses Sentrifugasi Mengakibatkan Komposisi Dari Clot Fibron Di Tengah Tabung, Antara Sel Darah Merah Di Bawah Dan Poor Platelet Serum Di Atas; C. Clot PRF, Setelah Pengambilan PRF dari Tabung; D. Membran PRF Setelah Proses Kompresi. (Dohan Et Al., 2006)	48
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	51
Gambar 4.1 Rancangan Penelitian	56
Gambar 4.2 Protokol Penelitian	63
Gambar 5.1 Gambaran Klinis Keratitis Hewan Coba	72
Gambar 5.2 Pemeriksaan Defek Kornea Pada Hari Ke-10	73
Gambar 5.3 Perbedaan Rerata Ekspresi α -SMA Antara Kelompok Antibiotik (K1) dan Antibiotik + Membran PRF (K2).....	74
Gambar 5.4 Perbandingan Ekspresi α -SMA	75
Gambar 5.5 Perbedaan Rerata Ekspresi TGF- β Antara Kelompok Antibiotik (K1) dan Antibiotik + Membran Prf (K2).	78
Gambar 5.6 Perbandingan Ekspresi TGF- β Pada Epitel Kornea (Panah) dan Sel Endotel (Kepala Panah) Serta Stroma (*) Diantara Kelompok Perlakuan	80

DAFTAR LAMPIRAN

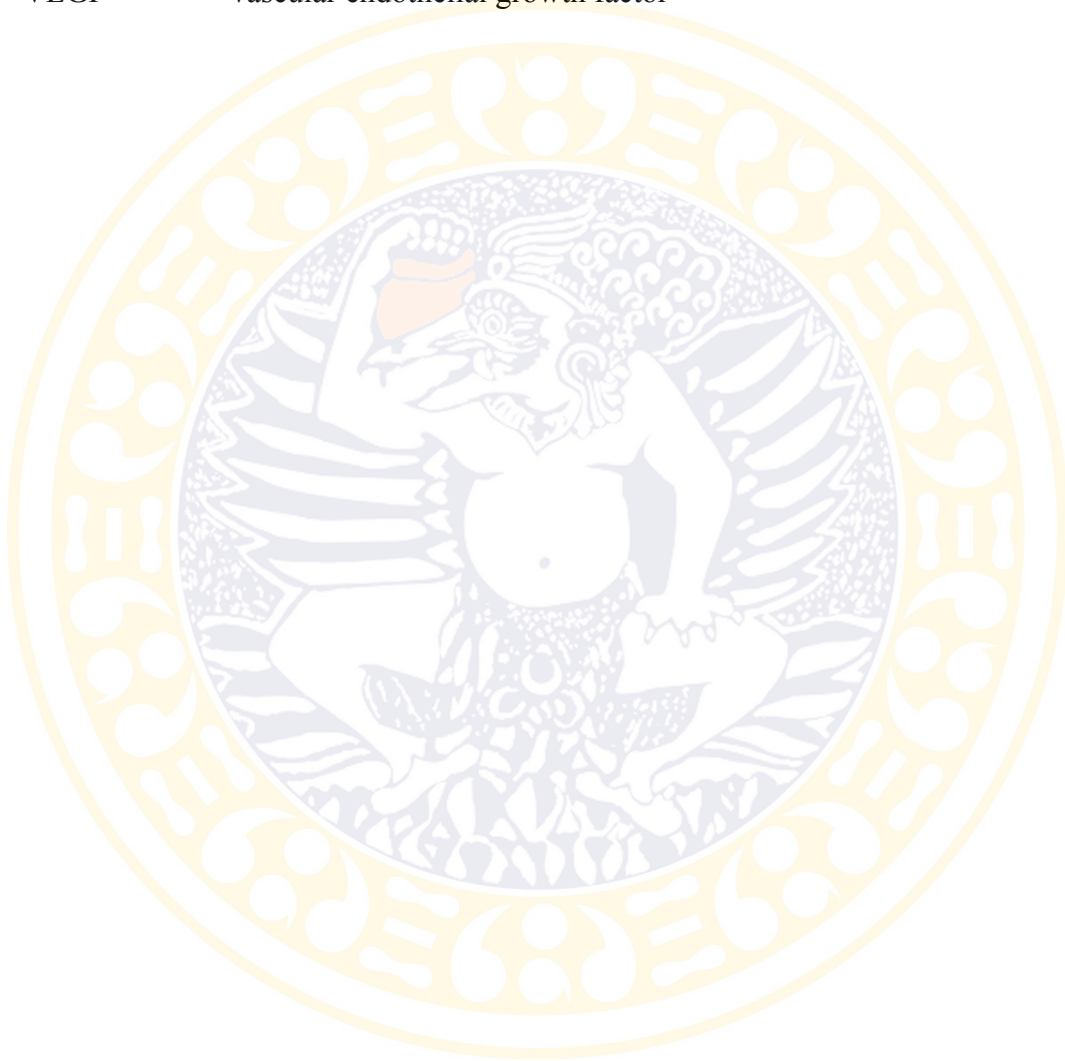
	Halaman
Lampiran 1	108
Lampiran 2	109
Lampiran 3	110
Lampiran 4	111
Lampiran 5	112
Lampiran 6	113



DAFTAR SINGKATAN

α -SMA	alpha-smooth muscle actin
ADP	adenosin difosfat
AP	alkaline protease
ATP	adenosin trifosfat
BMP	Bone Morphogenic Proteins
CFU	Colony-Forming Unit
Datin	Data dan informasi
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	fibroblast growth factor
FKH	Fakultas Kedokteran Hewan
FST	follistatin
HSV	herpes simplex virus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF	insulin-like growth factor
IHC	imunohistokimia
IL-1	Interleukin-1
IL-1 α	Interleukin-1 apha
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IRS	<i>Immuno Reactive Score</i>
LLC	large latent complex
LPS	lipopolisakarida
MMC	mitomycin C
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PASP	P. aeruginosa small protease
PDGF	platelet-derived growth factor
PIV	protease IV
PMN	Polimorfonuklear
PPP	<i>Platelet-Poor Plasma</i>
PRF	platelet-rich fibrin
PRK	photorefractive keratectomy
PRP	platelet-rich plasma
RCT	randomized controlled trial
rpm	<i>revolutions per minute</i>
ROS	reactive oxygen species
SLC	small latent complex

TBCL	<i>therapeutic bandage contact lens</i>
TGF- β	transforming growth factor-beta
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TSP	thrombospondin
uPA	urokinase
VEGF	vascular endothelial growth factor



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Keratitis merupakan peradangan kornea dari berbagai penyebab dan manifestasi klinis, karena gangguan mekanisme pertahanan yang disebabkan oleh cedera atau defek epitel kecil, berbagai jenis patogen atau pengaruh lingkungan dapat menyebabkan peradangan kornea. Keratitis dibagi menjadi dua, yaitu keratitis infeksi dan non infeksi (Salmon, 2020). Keratitis infeksi disebabkan karena infeksi bakteri, virus, jamur, atau protozoa (Srinivasan, 2012). Keratitis bakteri biasanya berkembang jika mekanisme pertahanan mata mengalami gangguan. Mikroba penyebab tersering antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptokokus Pyogenes*. (Salmon, 2020; Lap-Ki Ng et al, 2015). Interaksi yang kompleks antara bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan inang, bakteri ini memiliki kemampuan khas yaitu memicu respon imun yang hebat dan menyebabkan kerusakan jaringan lokal. Fibrosis dapat terbentuk dan menyebabkan kehilangan penglihatan, serta pada kasus yang berat dapat menyebabkan perforasi kornea atau menyebar ke jaringan sekitarnya (Alicia Eby M. dan Linda Hazlett D., 2016). *Pseudomonas aeruginosa* dapat meningkatkan ekspresi caspase-1, TNF, caspase-3 ketika menurunkan ekspresi reseptor *interacting protein kinase 3*, yang merupakan biomarker kunci dalam mekanisme kematian sel epitel kornea (Ismi Zuhria, Nurwasis, Eddy Bagus Wasito, Winarto, I Ketut Sudiana, Reny I'tishom, 2021).

Kekeruhan kornea adalah penyebab kebutaan kelima di dunia, dengan prevalensi sebesar 3,2% pada kasus yang dilaporkan. Organisasi WHO melaporkan bahwa 6 juta populasi dunia yang mengalami kebutaan disebabkan karena penyakit kornea (Flaxman et al, 2017). Diantara semua etiologi seperti infeksi, trauma, peradangan, degenerasi, dan kekurangan gizi, kasus keratitis infeksi merupakan penyebab utama kebutaan kornea di negara maju dan negara berkembang, dengan perkiraan kasus sebesar 2,5-799 per 100.000 penduduk per tahun. Pada studi di India, dilaporkan 57,52% kasus kekeruhan kornea disebabkan karena keratitis infeksi dengan lokasi kekeruhan kornea tersering di area sentral sebesar 49,35% dan sikatrik kornea berupa nebula sebesar 42,85% (Nimmy Raj, Noopur Gupta, Deepak Kumar, Praveen Vashist, 2021). Pada studi lain di India melaporkan kasus kekeruhan kornea sebesar 76,18%, diantaranya memiliki sikatrik kornea, dengan kasus sikatrik kornea yang dilaporkan adalah nebula kornea (20,1%), makula kornea (46,1%), dan leukoma (28,4%), dan leukoma adheren (5,4%) (Ritika Mukhija, Noopur Gupta, Praveen Vashist, Radhika Tandon, 2020). Menurut data info datin tahun 2014, kebutaan yang disebabkan oleh kekeruhan kornea merupakan penyebab keempat kebutaan di Indonesia (Kementrian Kesehatan, 2015). Pada studi yang dilakukan di Indonesia, yang dilaporkan di RS Cipto Mangunkusumo Jakarta periode 2008 - 2011 oleh Asroruddin *et al* ditemukan penyebab terbanyak keratitis infeksius karena bakteri pada hasil kultur mikroba adalah bakteri *Psuedomonas spp* sebesar 25% (Asroruddin et al., 2015). Pada studi lain di India dilaporkan sebesar 68,71% kasus kekeruhan kornea disebabkan oleh

keratitis *Pseudomonas aeruginosa* yang membutuhkan tindakan keratoplasti (Vazirani et al., 2015).

Tujuan perawatan medis keratitis adalah untuk mengobati infeksi dan mencegah komplikasi seperti perforasi kornea, kemudian membantu proses reepitelisasi dengan manajemen awal pengobatan menggunakan terapi medikamentosa, dan jika tidak responsif maka dilanjutkan dengan intervensi bedah. Beberapa pilihan terapi pembedahan sudah tersedia, dan untuk pemilihannya tergantung pada etiologi dan parameter keratitis, yaitu ukuran, kedalaman, dan lokasi. Salah satu pilihan terapi pembedahan yang digunakan adalah transplantasi membran amnion yang digunakan pada kasus keratitis dengan komplikasi *descemetocoele* (Mehmet et al, 2016; Stamate Alina-Cristina, Tătaru Călin Petru, 2019). Transplantasi membran amnion adalah biomaterial yang sering digunakan pada kasus keratitis. Transplantasi membran amnion pada kasus *descemetocoele* dapat memberikan efek tektonik sehingga tidak terjadi perforasi kornea, dan ketika membran amnion digunakan sebagai *graft* untuk mempromosikan epitelisasi kornea. Membran amnion memiliki kelemahan yaitu adanya resiko transmisi penyakit, warnanya yang kurang transparan, kualitasnya yang dapat bervariasi dan kekuatan mekanisnya yang lemah (Drechsler et al., 2017; Can et al., 2016).

Platelet-rich fibrin banyak mengandung trombosit sehingga memiliki keunggulan dibandingkan *Platelet-rich plasma* (PRP), dapat membantu dalam proses hemostasis, migrasi sel, dan proliferasi untuk penyembuhan luka (Prabawati et al., 2022). Membran *Platelet-rich fibrin* (PRF) adalah generasi kedua konsentrat platelet

yang dikembangkan pertama kali oleh Choukroun *et al* dari Perancis yang digunakan di bidang oral dan maksilofasial. Membran PRF banyak mengandung matriks protein serta faktor pertumbuhan yang penting dalam membantu proses penyembuhan luka seperti *platelet-derived growth factors* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *transforming growth factor* (TGF- β) yang dilepaskan bertahap selama 7 hingga 28 hari (Dohan *et al.*, 2006; Ghanaati *et al.*, 2014; Miron *et al.*, 2017). *Platelet-rich fibrin* (PRF) dimana polimerisasinya terjadi dengan perlahan, alami dan menghadirkan thrombin secara fisiologis dan progresif sehingga dapat mengendalikan pelepasan *growth factor* dan menjatuhnya dalam jaringan fibrin selama beberapa waktu tertentu sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka (Khiste and Tari, 2013; Eslani *et al.*, 2014; Steinhoff, 2016). Matriks fibrin yang merupakan gabungan dari trombosit terkonsentrasi, *growth factor*, sitokin, circulating stem cell, dan sedikit leukosit akan memiliki peran kemotaktik dalam penyembuhan luka. Selain itu, membran PRF juga memberikan fungsi mekanis sebagai kerangka tempat proliferasi, diferensiasi dan migrasi sel yang penting untuk regenerasi jaringan. Kombinasi fungsi mekanis dan kemotaktik dari membran PRF membuatnya cocok sebagai biomaterial *autologous* untuk rekonstruksi, perbaikan, dan pemeliharaan permukaan okuli (Mehmet *et al*, 2016; Ghanaati *et al.*, 2014; Miron *et al.*, 2017). Alio *et al* menjelaskan penggunaan membrane PRF sebagai alternatif untuk pasien perforasi kornea belum digunakan untuk perbaikan kornea hingga sekarang, karena pencangkakan membran PRF membutuhkan proses yang kompleks dan mahal (Mehmet *et al*, 2016; Jorge L Alio, Alejandra E Rodriguez, Lorena M Martinez, 2013).

Pencangkakan membran PRF pada descemetocoele adalah teknik bedah baru, tampak aman dan efektif, yang menjaga integritas anatomi mata. Di sampingnya arsitektur fibrin 3-D autologus, pelepasan berkepanjangan faktor pertumbuhan yang penting untuk regenerasi jaringan, penggabungan dengan kornea sehat di sekitarnya, dan induksi sintesis lamela kolagen baru adalah keuntungan utama dari membran PRF. Selain itu juga dapat mengoptimalkan penyembuhan luka, membran PRF dapat mencegah pembentukan fibrosis dengan cara memodifikasi ekspresi TGF- β dan menekan ekspresi berlebihnya. Hal tersebut sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Intriago di tahun 2017 yang meneliti pengaruh membran PRF pada sel gingiva manusia secara *in vitro*. Pada penelitian tersebut disimpulkan bahwa membran PRF mendorong fase awal penyembuhan luka. Namun, juga mencegah pembentukan fibrosis melalui supresi diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas (Mehmet *et al*, 2016; Can *et al.*, 2016; Intriago, 2017). Fibrosis terbentuk oleh karena deposisi berlebih dan abnormal komponen matriks ekstraseluler. TGF- β adalah kunci utama proses fibrosis dalam penyembuhan luka, berperan dalam stimulasi migrasi fibroblas yang berfungsi mensintesis matriks ekstraseluler. Matriks ekstraseluler tersusun dari kolagen (komponen terbanyak), myofibroblas yang berperan dalam penutupan luka dan protein lainnya. Myofibroblas mengandung aparatus *smooth muscle cell*, α - *smooth muscle actin* (α -SMA) dan dapat diidentifikasi melalui pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi α -SMA. Myofibroblas telah terdeteksi pada kontraktur luka di kulit, kornea dan konjungtiva. Aktivasi jangka panjang fibroblas pada organ yang terkena mengakibatkan deposisi matriks ekstraseluler berlebih dan kolagen dan myofibroblas

yang berlebih pula. Memodulasi aktivitas fibroblas, terutama pada fase proliferasi, menjadi mekanisme penting untuk mengontrol hasil akhir penyembuhan luka (Verrechia & Mauviel, 2007; Can *et al.*, 2016; Zada *et al.*, 2017).

Studi eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui efek membran PRF dalam penyembuhan luka kornea karena keratitis, terutama pada myofibroblas yang terekspresi oleh antibodi α -SMA intraseluler dan aktivitas TGF- β .

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat penurunan ekspresi α -SMA pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa* pasca pemberian membran PRF?
2. Apakah terdapat penurunan ekspresi TGF- β pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa* pasca pemberian membran PRF?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh pemberian membran PRF terhadap ekspresi α -SMA dan TGF- β pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis penurunan ekspresi α -SMA pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa* pasca pemberian membran PRF.
2. Menganalisis penurunan ekspresi TGF- β pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa* pasca pemberian membran PRF.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Memberikan fakta dan informasi ilmiah tentang pengaruh membran PRF terhadap ekspresi α -SMA dan TGF- β pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Memberikan informasi data ilmiah mengenai membran PRF sebagai biomaterial untuk rekonstruksi permukaan okuli.

1.4.2 Manfaat Praktis

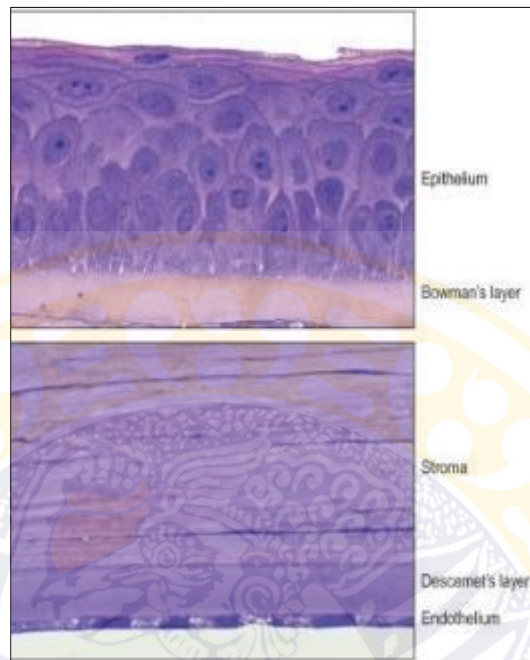
Hasil penelitian akan menjelaskan pengaruh pemberian membran PRF terhadap peningkatan ekspresi α -SMA dan TGF- β pada kornea dan dapat digunakan sebagai dasar untuk penggunaan membran PRF sebagai salah satu alternatif biomaterial untuk rekonstruksi permukaan okuli, terutama kornea. Selain itu, dapat meningkatkan dikembangkannya penelitian lanjutan mengenai membran PRF pada kasus keratitis bakterial untuk membantu proses penyembuhan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi dan Fisiologi Kornea

Kornea adalah jaringan avaskular transparan yang terdiri dari 5 lapisan yaitu: epitel, lapisan bowman, stroma, membran descemet, dan endotel (Gambar 2.1). Pada orang dewasa, ukuran kornea 11-12 mm secara horizontal dan 10-11 mm secara vertikal. Ini sekitar 500-600 μm tebal di bagian tengahnya dan secara bertahap bertambah ketebalannya ke arah perifer. Untuk nutrisinya, kornea bergantung pada difusi glukosa dari aqueous humor dan dari oksigen melalui film air mata. Selain itu, kornea perifer disuplai dengan oksigen dari sirkulasi limbus. Kepadatan ujung saraf di kornea termasuk yang tertinggi di tubuh, dan sensitivitas kornea 100 kali lipat sensitivitas konjungtiva. Serabut saraf sensorik memanjang dari saraf siliaris panjang dan membentuk pleksus subepitel. Pleksus saraf subepitel dan stroma disuplai oleh cabang pertama nervus trigeminus (Weisenthal et al, 2019). Epitel kornea memiliki ketebalan 50-90 μm dan sedang terdiri dari lima hingga tujuh lapisan bertingkat, skuamosa dan sel non-keratin. Ini mewakili 10% dari total ketebalan kornea. Epitel kornea terdiri dari 4-6 lapisan, yang meliputi 1 sampai 2 sel skuamosa superfisial, sel “sayap” (*wing cells*) bagian tengah dan sel basal yang lebih dalam (Sharma, N., Vajpaye, 2008).



Gambar 2.1 Anatomi kornea (Susan Stading; Henry Gray, 2008)

Epitel dan film air mata membentuk permukaan yang halus secara optik. Persimpangan ketat antara sel epitel superfisial mencegah penetrasi cairan air mata ke dalam stroma. Proliferasi sel induk limbal secara terus menerus menimbulkan lapisan lain, yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel superfisial. Pada saat pematangan, sel-sel yang berdiferensiasi ini dilapisi dengan mikrovili di permukaan terluarnya dan kemudian meneteskan air mata. Proses diferensiasi memakan waktu sekitar 7-14 hari. Sel epitel basal mengeluarkan membran basal setebal 50 nm yang kontinu terdiri dari kolagen tipe IV, laminin, dan protein lainnya (Weisenthal et al, 2019).

Lapisan Bowman adalah zona seperti membran aseluler, Tebal 8 hingga 15 μm dan memiliki banyak pori untuk bagian tersebut saraf kornea ke epitel. Secara ultrastruktur itu terdiri dari jalinan seragam yang halus fibril kolagen tipe I dan III (Sharma, N., Vajpaye, 2008). Lapisan Bowman terletak di anterior stroma kornea. Sebelumnya dianggap sebagai membran, itu Lapisan bowman adalah kondensat aseluler dari bagian paling anterior stroma. Lapisan ini membantu mempertahankan bentuk kornea. Saat terganggu, tidak akan terjadi regenerasi (Weisenthal et al, 2019).

Stroma kornea membentuk sekitar 90% dari total ketebalan kornea, tebal stroma kornea kira-kira 500 μm dan terletak di antara lapisan Bowman dan membran Descemet (Sharma, N., Vajpaye, 2008). Sistem pengaturan yang teratur dari sel stroma (keratosit), serat, dan matriks ekstraseluler diperlukan untuk kejernihan kornea. Keratosit bervariasi dalam ukuran dan kepadatan di seluruh stroma dan membentuk 3 jaringan dimensional di seluruh kornea, antara lain fibroblas pipih, terletak di antara lamela kolagen stroma, dan mereka terus menerus menyerap dan membuat stroma molekul. Stroma kornea terdiri dari matriks ekstraseluler yang terbentuk dari kolagen dan proteoglikan. Transparansi kornea bergantung pada pemeliharaan kadar air stroma kornea sebesar 78%. Hidrasi kornea bervariasi dari anterior ke posterior dan meningkat lebih dekat ke endotel (Weisenthal et al, 2019).

Membran Descemet adalah membran basal dari endotel kornea dan disintesis oleh endotel yang memiliki ukuran 3 μm saat lahir dan saat dewasa

ukuran bertambah besar menjadi 10-12 μm (Weisenthal et al, 2019). Ada dua daerah berbeda yaitu anterior, satu setengah sampai sepertiga, yang terikat dan posterior dua pertiga, yang tidak terikat. Pada jenis keratitis bakterial dan Moosren's ulserasi, membran ini tetap utuh dan menonjol sebagai descemetocoele karena tekanan intraokular dan kerusakan struktur stroma (Sharma, N., Vajpaye, 2008). Meski kontroversial, ada laporan yang menyampaikan terdapat lapisan baru di bagian posterior kornea (lapisan pra-Descemet atau lapisan Dua) (Weisenthal et al, 2019).

Sel endotel kornea terletak di permukaan posterior kornea, membentuk lapisan tunggal sel-sel yang terintegritas padat dalam pola mosaik yang sebagian besar berbentuk heksagonal . Ada sekitar 400.000 sel, tebal 4 hingga 6 μm . Sel-sel ini memiliki lebar 20 μm (Sharma, N., Vajpaye, 2008). Jika kehilangan sel terjadi, terutama akibat trauma atau pembedahan, area yang rusak ditutupi melalui pembesaran dan penyebaran sel sisa atau mungkin sel induk perifer. Kepadatan sel bervariasi di atas permukaan endotel; normalnya, konsentrasinya adalah tertinggi di darah perifer. Kepadatan sel endotel pusat menurun seiring bertambahnya usia pada tingkat rata-rata sekitar 0,6%/ tahun, berkurang dari hitungan sekitar 3400 sel/ mm^2 pada usia 15 tahun ke sekitar 2300 sel/ mm^2 pada usia 85 tahun. Jumlah sel endotel sentral normal adalah antara 2000 dan 3000 sel/ mm^2 . Telah diamati bahwa mata dengan jumlah sel endotel di bawah 500 sel/ mm^2 mungkin berisiko mengalami edema kornea. Endotel mempertahankan kornea transparansi dengan mengontrol hidrasi kornea dan mempertahankan deturgescence melalui stroma

berfungsi sebagai penghambat aqueous humor dan sebagai pompa metabolisme yang menggerakkan ion, dan menarik air secara osmotik, dari stroma ke aqueous humor (Weisenthal et al, 2019).

2.2 Keratitis Bakteri

Keratitis Infeksi (mikrobial keratitis) adalah salah satu yang paling penting penyebab kekeruhan kornea, yang penyebab umum kebutaan kedua di seluruh dunia setelah katarak (Narsami et al., 2009). Keratitis infeksi adalah proses yang dapat mengancam penglihatan yang ditandai dengan defek epitel kornea dengan adanya peradangan pada stroma kornea. Bakteri, virus, jamur dan organisme parasit semuanya mungkin terjadi penyebab kondisi darurat medis ini. Faktor risiko predisposisi yang paling umum untuk mengembangkan keratitis menular termasuk pemakaian lensa dalam waktu lama melebihi waktu yang dianjurkan, tidak memadai desinfeksi lensa kontak (kontaminasi kotak penyimpanan lensa kontak atau cairan lensa kontak), trauma, operasi mata dan kelopak mata sebelumnya, terutama operasi kornea (operasi bedah refraksi dan keratoplasti), penyakit permukaan mata kronis (defisiensi lapisan air mata, kornea paparan karena kelainan anatomi dan fungsi kelopak mata, penyakit sistemik (diabetes mellitus, status immunocompromised), penggunaan jangka panjang kortikosteroid topikal. Kondisi klinis yang ditimbulkan bervariasi dan tergantung pada jenis agen penyebab (Srinivasan, 2012). Fibrosis pada kornea berkembang sebagai akibat dari

keratitis infeksius supuratif dan menjadi penyebab tersering kedua dari kebutaan yang dapat dicegah setelah katarak di antara orang-orang di Asia, Afrika dan di Timur Tengah (Akter et al., 2010). Keratitis infeksi sebagai keadaan darurat medis yang serius dan dapat mengancam mata membutuhkan pengobatan yang cepat dan tepat. Pilihan pengobatan termasuk antibakteri lokal dan sistemik, obat antijamur dan antivirus yang bergantung pada penyebab dan tingkat keparahan penyakit (Srinivasan, 2012).

Keratitis bakterial adalah defek pada epitel kornea dengan nekrosis pada jaringan stroma di bawahnya yang disebabkan infeksi bakteri. Infeksi ini dipengaruhi beberapa faktor antara lain faktor virulensi bakteri, ukuran inokulum dan daya pertahanan alami dari inang. Faktor virulensi dari bakteri yang memiliki kemampuan untuk melekat, menghindari, menyerang, memperbanyak diri, dan menetap. Faktor keganasan bakteri menyebabkan perbedaan kemampuan hidup organisme. Selain itu bakteri memiliki kemampuan yang berbeda dalam memicu infeksi yang ditentukan mekanisme pertahanan inang dimana menentukan besarnya inokulum. Pertahanan inang ini dipengaruhi kondisi intrinsik mata yang mengakibatkan defek epitel. Penyebabnya antara lain trauma abrasi akut, keratopati bulosa, erosi kornea berulang, kerusakan epitel berulang, benda asing yang tertinggal, atau bedah kornea. Selain itu kemampuan imunologis dari inang yang menurun baik lokal maupun sistemik mempermudah terjadinya infeksi (Hilliam et al., 2020).

2.3 Patogenesis Keratitis Bakterialis

Keratitis mikroba merupakan suatu infeksi yang dapat mengancam penglihatan, yang dapat disebabkan oleh bakteri, jamur, dan parasit. Defek dan cedera epitel merupakan beberapa faktor predisposisi terhadap infeksi patogen pada organ mata. Spesies bakteri yang paling sering menjadi etiologi keratitis bakterialis di antaranya *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, dan spesies *Serratia*. Tanda dan gejala klinis pada keratitis bakterialis meliputi nyeri akut, kemerahan, fotofobia, dan ulserasi kornea. Keratitis yang diakibatkan oleh *Pseudomonas* umumnya memiliki presentasi yang lebih berat dibandingkan ulkus akibat spesies bakteri lainnya dan seringkali menjadi tantangan dalam penatalaksanaannya, yang berujung pada risiko prognosis penglihatan yang lebih buruk dibandingkan ulkus bakteri lainnya (Lakhundi et al., 2017).

Keratitis bakterialis menyumbang hingga 90% dari seluruh kasus keratitis mikroba, dengan *P. aeruginosa* sebagai etiologi tersering. Infeksi kornea oleh *Pseudomonas* sering dikaitkan dengan penggunaan lensa kontak, dan insidensinya dilaporkan jarang terjadi sebelum penggunaan lensa kontak secara luas. Selain *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* dan *S. aureus* juga merupakan etiologi tersering dari keratitis bakterialis. *S. aureus* merupakan organisme komensal yang dapat menginfeksi mata apabila terdapat faktor predisposisi, di antaranya operasi atau trauma mata, penggunaan lensa kontak, infeksi virus atau kelainan mata lainnya yang mempengaruhi imunitas organ mata (Lakhundi et al., 2017).

Bakteri mengawali proses infeksi dengan interaksi antara sel *host* dan reseptor permukaan melalui berbagai molekul adhesin, yang memediasi penempelan bakteri pada sel-sel epitel kornea. Adhesin tidak hanya berperan pada penempelan bakteri pada permukaan sel, namun juga berperan aktif pada interaksi-interaksi dan proses infeksi yang terjadi selanjutnya. Adhesin dapat berperan sebagai toksin yang menginisiasi invasi mikroba dan berkontribusi terhadap kaskade patogenik yang terjadi selanjutnya (Lakhundi et al., 2017).

Setelah terjadi penempelan pada permukaan epitel, patogen kemudian menginvasi stroma kornea. Invasi stroma ini difasilitasi melalui enzim-enzim protease dan eksotoksin, yang mengakibatkan degradasi *basement membrane* dan matriks ekstraseluler, yang selanjutnya berujung pada lisis sel. Pasca invasi bakteri ke dalam kornea, proses infeksi berlanjut menuju proses kerusakan kornea yang difasilitasi oleh enzim-enzim protease pada bakteri, aktivasi enzim metalloproteinase, dan stimulasi respons imun *host* yang mengakibatkan kerusakan lebih lanjut akibat pelepasan dari intermediet-intermediet *reactive oxygen species* (ROS) dan enzim-enzim protease dari *host*. Protease berkontribusi pada patogenesis keratitis dengan mendegradasi *basement membrane*, laminin, proteoglikan, kolagen, dan matriks ekstraseluler.

P. aeruginosa memiliki kemampuan untuk mensekresikan setidaknya tujuh jenis enzim protease berbeda, yang meliputi elastase A dan B, *modified elastase*, alkaline protease, protease IV, *P. aeruginosa small protease* dan *large exoprotease*, di mana beberapa di antaranya memainkan peranan potensial pada

patogenesis keratitis. Enzim-enzim metalloprotease, khususnya elastase B (Las B) dan alkaline protease (AP), memainkan peranan penting pada keratitis, di mana injeksi Las B pada stroma kornea terbukti mengakibatkan kerusakan kornea yang signifikan. Di lain sisi, protease IV (PIV) memecah berbagai protein yang berperan dalam mekanisme pertahanan *host*, di antaranya immunoglobulin, protein komplemen, peptida antimikroba, dan surfaktan, sehingga PIV juga turut berkontribusi pada sifat virulensi dari *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa small protease* (PASP) memiliki kemampuan untuk memecah kolagen, komponen struktural utama dari stroma kornea, sehingga dapat mengakibatkan obliterasi kornea. Injeksi PASP murni pada kornea kelinci terbukti mengakibatkan destruksi epitel dan pembentukan luka-luka erosi yang dapat mencapai stroma. Temuan tersebut mengindikasikan bahwa PIV berperan dalam sistem pertahanan bakteri terhadap berbagai komponen imunitas dari *host*, sedangkan PASP mendegradasi komponen struktural kolagen dari mata, di mana kedua proses tersebut turut memediasi patofisiologi dari keratitis.

Molekul polisakarida dari kapsul *S. pneumoniae* yang awalnya diperkirakan dogma sentral virulensi pada keratitis akibat *S. pneumoniae*, terbukti tidak menjadi satu-satunya faktor virulensi yang dimiliki oleh *S. pneumoniae*. Selain kapsul, faktor virulensi *S. pneumoniae* yang saat ini marak diteliti adalah pneumolisin, sebuah molekul toksin yang tergolong ke dalam famili *bacterial cholesterol-dependent cytolysin*. Pneumolisin dapat menyebabkan kerusakan sel secara langsung melalui ikatan dengan kolesterol di dalam membran sel *host* yang

diikuti dengan polimerisasi menjadi 30-50 mer, sehingga dapat membentuk pori-pori pada membran sel *host*. Selain membentuk pori, pneumolisin juga menginisiasi kerusakan sel imun dengan mengaktivasi sistem komplemen dan mencetuskan proses inflamasi (Lakhundi et al., 2017).

Staphylococcus aureus mensekresikan *alpha-haemolysin toxin*, yang terbukti dapat mengganggu proses penyembuhan luka epitel kornea dan mendukung invasi patogen di dalam lapisan-lapisan dalam dari kornea. Pemberian antibiotik umumnya dapat mengeradikasi bakteri, namun tidak turut mengeradikasi toksin dari bakteri. Dengan demikian, tata laksana keratitis yang menargetkan toksin-toksin bakteri dapat menjadi pendekatan terapeutik yang efektif seiring dengan pemberian antibiotik. Penargetan faktor virulensi dibandingkan dengan mikroorganisme etiologi juga berasosiasi dengan risiko resistensi terapi yang lebih kecil (Hazlett et al., 2016; Putra et al., 2019).

2.4 Peranan Sitokin dan Faktor Pertumbuhan pada Keratitis Bakterialis

Onset dan perjalanan penyakit dari keratitis bakterialis dapat dikelompokkan menjadi beberapa tahapan. Seperti yang telah dijelaskan pada subbab sebelumnya, kejadian yang mendahului perkembangan penyakit keratitis bakterialis di antaranya adalah proses adhesi bakteri pada permukaan mata dan kerusakan barier epitel kornea akibat trauma, penggunaan lensa kontak, atau *insult* lainnya. Pada kasus-kasus dengan kelainan alergi berat, proses alergi pada

konjungtiva dihubungkan dengan pelepasan berbagai sitokin dan mediator-mediator sitotoksik, seperti interleukin (IL)-4, IL-13, dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dari limfosit T, serta protein-protein sitotoksik yang disekresikan oleh eosinofil. Faktor-faktor ini dapat menyebabkan kerusakan epitel kornea dan mengganggu fungsi barier dari epitel kornea (Nishida et al., 2021).

Tabel 2.1 Fase-fase infeksi kornea oleh bakteri (Nishida et al., 2021)

Fase	Manifestasi Klinis	Peranan Utama	Patobiologi	Terapi
<i>Preceding event</i>	Kerusakan barier epitel dan adhesi bakteri	Bakteri	Trauma, penggunaan lensa kontak, inflamasi	Menjaga higienitas lensa kontak, pemberian antimikroba profilaksis
Fase I	Onset keratitis	Bakteri (PAMP), fibroblas kornea, PMN	Respons imunitas bawaan oleh sel-sel fibroblas kornea	Eradikasi bakteri dengan pemberian antimikroba
Fase II	Onset ulkus kornea	Bakteri	Degradasi kolagen oleh enzim protease	Eradikasi bakteri dengan pemberian antimikroba. Belum ada tata laksana yang tersedia kecuali pemberian steroid untuk memperlambat laju <i>corneal melting</i>
		Fibroblas kornea	Degradasi kolagen oleh kaskade uPA-plasmin-MMP	

Fase	Manifestasi Klinis	Peranan Utama	Patobiologi	Terapi
Fase III	<i>Corneal melting</i> berkepanjangan dan perforasi kornea	Sel-sel fibroblas kornea dan PMN	Interaksi 'lingkaran setan' antara PMN dan sel- sel fibroblas	Terapi pembedahan yang meliputi transplantasi kornea

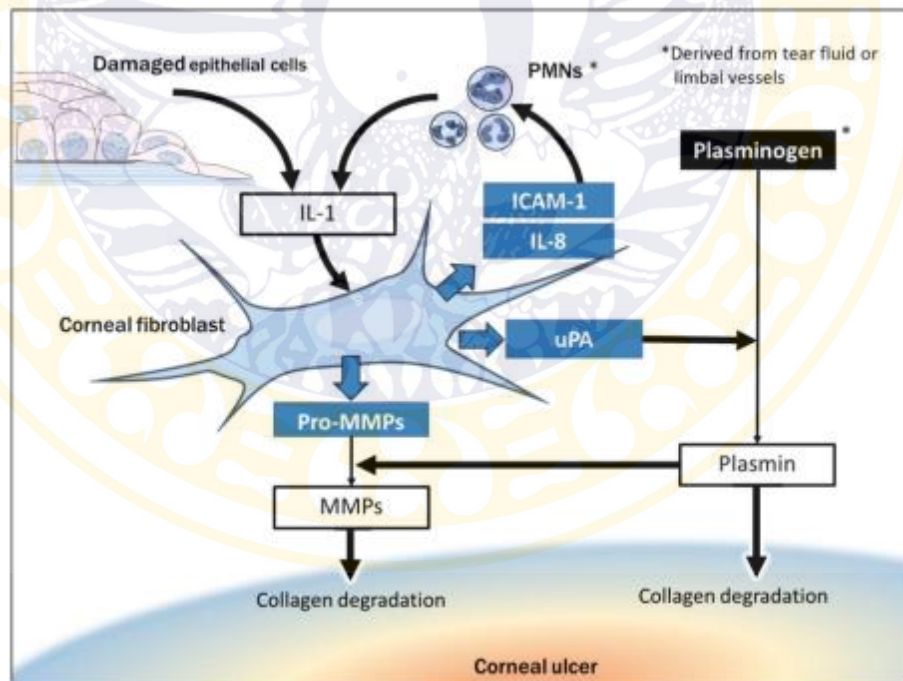
Pada keratitis infeksi, sel-sel keratosit yang berada pada stroma kornea memiliki peranan yang lebih besar dalam mencetuskan respons imun bawaan *host* dibandingkan dengan sel-sel keratosit pada epitel kornea. Keratosit atau sel-sel fibroblas kornea (sel-sel keratosit yang teraktivasi) mengenali komponen-komponen bakteri melalui bagian dari protein *Toll-like receptor* (TLR). Lipopolisakarida (LPS), komponen yang ada pada membran sel bakteri gram negatif, dan peptidoglikan yang terdapat pada membran sel bakteri gram positif, dikenali melalui TLR-4 dan TLR-2 yang ada pada permukaan sel-sel fibroblas stroma kornea. LPS dan peptidoglikan yang merupakan bagian dari *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) akan menginduksi ekspresi dari berbagai kemokin dan molekul-molekul adhesi oleh sel-sel fibroblas stroma kornea. Air mata dari individu yang sehat mengandung *LPS binding protein* (LBP) dan *soluble* CD14 (sCD14) dalam kadar yang tinggi, dan kedua faktor tersebut memediasi respons imunitas bawaan yang diinduksi LPS oleh sel-sel fibroblas kornea. LPS yang disekresikan oleh bakteri gram negatif seperti *P. aeruginosa*, bersama dengan LBP dan sCD-14, menginduksi

produksi uPA dan MMP bersama dengan ekspresi kemokin IL-8 dan molekul adhesi *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) oleh sel-sel fibroblas kornea. Ekspresi IL-8 dan ICAM-1 menginduksi infiltrasi lokal dan aktivasi dari neutrofil polimorfonuklear (PMN), di mana sel-sel tersebut selanjutnya akan berperan dalam proses klirens dari patogen (Livingston et al., 2019; Nishida et al., 2021).

Infiltrasi dan aktivasi sel-sel inflamasi pada kornea yang terinfeksi yang dimediasi oleh kemokin, molekul-molekul adhesi, dan sitokin-sitokin lainnya selanjutnya akan menyebabkan terjadinya fase 3 dari keratitis bakterialis. Sel-sel inflamasi tersebut, khususnya sel-sel PMN, melepaskan berbagai sitokin-sitokin tambahan seperti IL-1 yang selanjutnya menstimulasi sel-sel fibroblas. Interaksi antara PMN dan sel-sel fibroblas selanjutnya mengakibatkan suatu proses ‘lingkaran setan’, di mana aktivasi berkepanjangan yang tidak terkontrol dari fibroblas-fibroblas kornea oleh sel-sel PMN mengakibatkan suatu proses penghancuran kornea yang disebut dengan *corneal melting*. Hingga saat ini, belum ada terapi yang tersedia untuk memperbaiki kerusakan kolagen pada fase ini. Pada kasus-kasus keratitis bakterialis yang telah berkembang ke dalam fase 3, luaran klinis pasien relatif buruk, di mana umumnya terjadi ulkus kornea dan perforasi kornea pada beberapa kasus, yang membutuhkan prosedur transplantasi kornea (Nishida et al., 2021).

Degradasi kolagen yang tidak terkontrol di dalam lapisan stroma kornea mendasari pembentukan ulkus kornea. Degradasi kolagen dimediasi oleh

pemecahan serat-serat kolagen dengan enzim-enzim protease ekstraseluler, endositosis fragmen-fragmen kolagen sebagai hasil interaksi dengan reseptor-reseptor kolagen, dan proses proteolisis intraseluler di dalam lisosom. Dua jalur utama yang berperan dalam destruksi kolagen adalah sebagai berikut: (1) degradasi kolagen yang dimediasi oleh enzim-enzim protease bakteri, dan (2) degradasi kolagen yang dimediasi oleh sel-sel fibroblas kornea. Degradasi kolagen oleh sel-sel fibroblas kornea diinduksi oleh interaksi antara fibroblas dengan PAMP bakteri, dengan sel-sel PMN yang menginfiltrasi atau sitokin-sitokin yang disekresikan, atau dengan molekul alarmin yang dilepaskan oleh sel-sel epitel kornea yang rusak (Madsen et al., 2017; Nishida et al., 2021).



Gambar 2.2 Jalur degradasi kolagen yang dimediasi oleh fibroblas kornea (Nishida et al., 2021)

2.5 Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA)

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) merupakan isoform aktin yang mendominasi sel-sel otot polos pembuluh darah dan memiliki peranan penting pada proses fibrogenesis. α -SMA juga terbukti terdapat di dalam fibroblas jaringan subkutan. Myofibroblas merupakan jenis fibroblas dengan metabolisme dan morfologi yang khas dan memiliki kemampuan untuk mengekspresikan α -SMA, dan aktivasi myofibroblas memainkan peranan penting pada respons fibrosis. Pada kondisi teraktivasi, myofibroblas berhenti berproliferasi dan mulai mensintesis protein-protein komponen ekstraseluler dalam kadar yang besar. Ekspresi α -SMA berkorelasi dengan laju aktivasi myofibroblas (Cherng et al., 2008).

Myofibroblas merupakan salah satu jenis sel fibroblas yang mengalami diferensiasi secara parsial menuju fenotip otot polos. Myofibroblas dapat berkontraksi dengan menggunakan beberapa jenis protein sitoskeleton yang umumnya ditemukan di dalam sel-sel otot polos, salah satunya α -SMA. Sel-sel ini memiliki kemampuan dalam mempercepat perbaikan jaringan dengan menyebabkan kontraksi tepi-tepi luka. Studi terdahulu menunjukkan bahwa jaringan granulasi yang didapatkan dari luka dapat berkontraksi secara *in vitro* dengan pola yang menyerupai otot polos ketika dipaparkan terhadap substansi yang dapat menyebabkan kontraksi otot polos, misalnya adrenalin atau angiotensin. Setelah proses penyembuhan luka selesai, sel-sel myofibroblas

mengalami apoptosis. Pada beberapa kelainan proses fibrosis, mekanisme apoptosis myofibroblas tersebut diperkirakan gagal terjadi, sehingga menyebabkan persistensi myofibroblas, ekspansi matriks ekstraseluler, dan kontraktur luka. Gaya kontraktile yang besar yang dihasilkan oleh myofibroblas memiliki peranan penting terhadap remodeling jaringan secara fisiologis, namun memiliki dampak negatif terhadap fungsi jaringan ketika dihasilkan secara berlebihan, misalnya pada kasus fibrosis hipertrofik. Beberapa karakteristik molekuler spesifik serta faktor-faktor yang dapat mengontrol diferensiasi fibroblas dapat menjadi target terapeutik yang potensial untuk mengatur fungsi myofibroblas, yang meliputi α -SMA dan penanda-penanda sitoskeleton myofibroblas, protein permukaan membran, dan matriks ekstraseluler (Cherng et al., 2008).

Aktin merupakan protein struktural berbentuk globular yang berpolimerisasi dalam pola heliks untuk membentuk filamen aktin. Filamen-filamen aktin membentuk sitoskeleton, sebuah jaringan tiga dimensi yang berada di dalam sel-sel eukariotik. Filamen-filamen aktin berperan dalam menyokong sel secara mekanis, menentukan bentuk sel, dan memungkinkan pergerakan sel. Bersama dengan miosin, aktin berperan dalam proses kontraksi otot di dalam sel-sel otot. Di dalam sitoplasma, sebagian besar aktin berikatan dengan ATP, namun aktin juga dapat berikatan dengan ADP (Cherng et al., 2008).

α -SMA memiliki berat molekul sebesar 40 kD. Masing-masing subunit dari aktin dikenal sebagai aktin globular, sedangkan polimer filamentosa yang tersusun atas subunit G-actin (mikrofilamen) dikenal sebagai F-aktin. Mikrofilamen merupakan komponen yang paling tipis dari sitoskeleton, dengan diameter 7 nm. Layaknya mikrotubulus, filamen aktin bersifat polar, di mana salah satu ujungnya bersifat positif dan *fast-growing* serta ujung lainnya bersifat negatif dan *slow-growing*. ADP-aktin berdisosiasi dari ujung negatif dan peningkatan ADP-aktin menstimulasi pertukaran ikatan ADP-aktin dengan ATP-aktin. Pergantian ikatan secara cepat ini berperan penting dalam pergerakan sel (Cherng et al., 2008).

Sel-sel keratosit merupakan komponen stroma kornea pertama yang memiliki kemampuan untuk berkontak dengan patogen penginfeksi ketika terjadi kerusakan barier epitel. Sel-sel tersebut dapat berdiferensiasi di dalam myofibroblas dan mengekspresikan α -SMA. Studi oleh Pergolizzi *et al.* membuktikan adanya ekspresi α -SMA pada model keratitis *ex vivo*. Studi lain oleh Spurlin dan Lwigale juga menunjukkan peningkatan jumlah sel-sel stroma positif α -SMA pada sampel kornea yang mengalami inflamasi (Pergolizzi et al., 2020; Spurlin III and Lwigale, 2013).

Spurlin dan Lwigale melaporkan adanya peningkatan ekspresi α -SMA pada proses penyembuhan kornea embrionik. Selain itu, ekspresi α -SMA pada luka kornea neonatus dan dewasa juga terbukti terjadi di dalam stroma kornea

dan bertahan dalam waktu yang lama (minggu hingga bulan) (Spurlin III and Lwigale, 2013b). Pergolizzi *et al.* membuktikan adanya temuan α -SMA di dalam epitel kornea pada model kornea dengan infeksi *herpes simplex virus-1* (HSV-1) (Pergolizzi et al., 2020).

2.6 Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β)

Ketiga isoform TGF- β melakukan persinyalan melalui tiga reseptor TGF- β , yaitu TGFBR1, TGFBR2, dan TGFBR3. Persinyalan TGF- β *canonical* terjadi setelah salah satu dimer faktor pertumbuhan TGF- β berikatan dengan TGFBR2, dan kompleks TGF- β -TGFBR2 kemudian merekrut dan melakukan fosforilasi pada TGFBR1. Kompleks TGFBR2-TGFBR1 ini kemudian melakukan fosforilasi modulator *downstream* SMAD2 dan SMAD3. Kompleks SMAD2-SMAD3 berasosiasi dengan SMAD4, dan SMAD2-SMAD3-SMAD4 mengalami translokasi menuju nukleus untuk mengontrol transkripsi dari gen TGF- β . Di sisi lain, apabila SMAD7 direkrut menuju kompleks TGFBR teraktivasi dan/atau SMAD2/3 yang terfosforilasi, hal tersebut memicu degradasi oleh enzim E3 ubiquitin ligase spesifik SMAD yang berada di dalam proteasom. Dengan demikian, SMAD7 menurunkan regulasi dari respons TGF- β , dan jalur ubiquitin-proteasom memodulasi persinyalan oleh TGF- β 1, TGF- β 2, atau TGF- β 3 (Wilson, 2021).

Beberapa molekul agonis atau antagonis telah dilaporkan dapat memfasilitasi atau menghambat ikatan TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 teraktivasi dengan kompleks reseptornya. Sebagai contoh, KCP/CRIM2, CHRDL1, dan BMPER/CV-2 dapat bekerja sebagai agonis maupun antagonis, bergantung kepada faktor pertumbuhan terkait dan apakah ada faktor pertumbuhan lainnya yang terdapat pada lingkungan. Modulator lainnya, seperti follistatin (FST), FSTL1, BMPER/CV-2, dan Lefty, dapat berikatan dengan TGFBR1 atau TGFBR2 untuk membentuk kompleks inaktif *non-signaling*, sehingga menurunkan regulasi respons sel terhadap TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 (Wilson, 2021).

TGF- β 1 dan TGF- β 2 terdapat di dalam air mata, dan TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 terdapat di dalam humor akuos. Salah satu sumber TGF- β di dalam air mata adalah epitel kornea karena epitel permukaan mata secara fisiologis memproduksi TGF- β 1 dan TGF- β 3, dan isotype-isotype faktor pertumbuhan ini kemungkinan dilepaskan pada saat proses *turnover* sel-sel epitel. Sel-sel endotel kornea yang normal juga turut memproduksi TGF- β 1, namun tidak memproduksi TGF- β 2. Pada kornea kelinci, protein TGF- β 1 atau TGF- β 2 diproduksi pada kadar yang rendah. TGF- β 2 tidak terdeteksi di dalam sel-sel epitel kornea, namun terdapat pada permukaan sel epitel dari kornea normal dan juga dideteksi pada permukaan stroma sesaat pasca prosedur *photorefractive keratectomy* (PRK) pada kelinci. Walaupun demikian, pasca cedera prosedur PRK pada kornea, protein TGF- β 1 dan TGF- β 2 dideteksi pada

berbagai jenis sel stroma, di antaranya keratosit, fibroblas kornea, myofibroblas, dan beberapa sel-sel turunan sum-sum tulang. mRNA TGF- β 1 dan TGF- β 2 juga mengalami peningkatan regulasi pada sel-sel epitel dan endotel kornea yang berdekatan terhadap luka. TGF- β 2 LAP juga terdeteksi pada epitel dan stroma kornea manusia, dan TGF- β 3 LAP terdeteksi di dalam stroma subepitel (Wilson, 2021; Rocher et al., 2020).

TGF-BR1 dan TGF-BR2 juga terdeteksi melalui pemeriksaan imunohistokimia di dalam stroma dan epitel kornea tikus yang mengalami luka maupun yang tidak mengalami luka. TGF-BR1, TGF-BR2, dan TGF-BR3 juga diekspresikan oleh sel-sel fibroblas stroma kornea manusia secara *in vitro*. IL-1 α atau IL-1 β mencetuskan apoptosis myofibroblas secara *in vitro* apabila konsentrasi TGF- β yang mensupresi apoptosis didapatkan rendah. Dengan demikian, pasca cedera epitel kornea atau endotel kornea yang meliputi cedera membran Descemet atau *extracellular basement membrane*, TGF- β 1 pada air mata dan epitel kornea masuk ke dalam stroma dan mengatur perkembangan myofibroblas matur dari sel-sel keratosit dan sel-sel prekursor fibrosit. Proses ini terus berlanjut hingga terjadi regenerasi dan penggantian *basement membrane* yang rusak, yang mengakibatkan penurunan kadar TGF- β 1 dan TGF- β 2 yang berasal dari epitel, lapisan air mata, dan/atau humor akuos (Wilson, 2021).

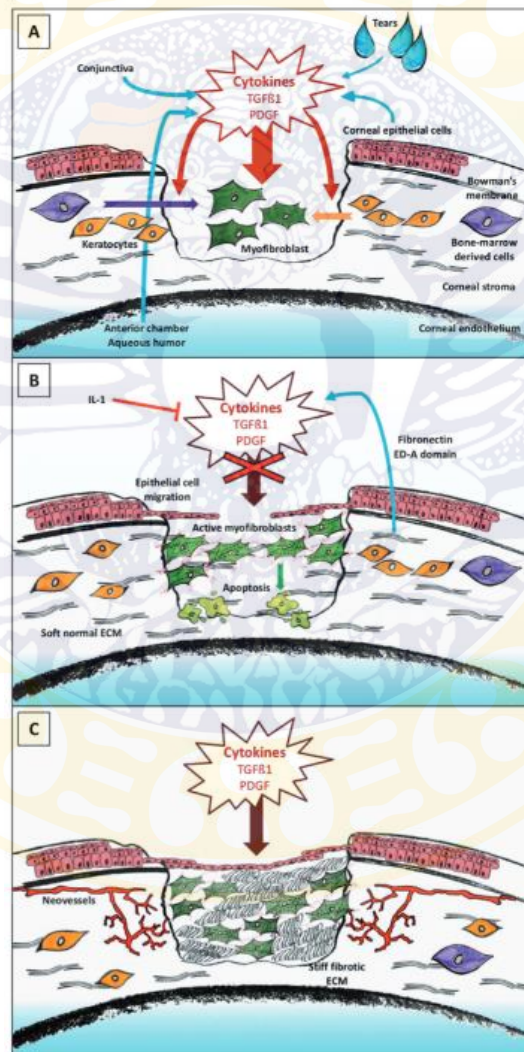
TGF- β merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang paling aktif terlibat pada proses penyembuhan luka kornea. Gambar 2.3 menunjukkan

diagram skematik dari proses penyembuhan luka kornea. Cedera kornea melibatkan ruptur lapisan kornea dan membran Bowman, yang selanjutnya mengakibatkan stroma anterior terpapar terhadap sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya, khususnya TGF- β dan PDGF yang berasal dari sel-sel epitel kornea, humor akuos, konjungtiva, dan air mata. Di bawah pengaruh TGF- β 1 aktif, sel-sel keratosit yang terdapat pada stroma anterior dan/atau sel-sel yang berasal dari sumsum tulang mengalami diferensiasi menjadi myofibroblas, berproliferasi, dan bermigrasi menuju lesi. Kadar TGF- β 1 secara efektif dipertahankan oleh adanya extra domain-A dari fibronectin di dalam matriks ekstraseluler. Sel-sel myofibroblas kemudian menutupi luka dan mulai mensintesis matriks ekstraseluler baru (Rocher et al., 2020).

Ketika proses penyembuhan lesi kornea selesai terjadi, sel-sel myofibroblas selanjutnya mengalami apoptosis yang diinduksi oleh IL-1. IL-1 diproduksi oleh sel-sel stroma dan memungkinkan rekolonisasi stroma anterior oleh keratosit. Sel-sel myofibroblas kemudian akan melakukan remodeling matriks ekstraseluler pada situs luka dengan kerja dari enzim MMP, sehingga terjadi restrukturisasi arsitektur jaringan kornea yang memiliki peranan penting dalam mengembalikan transparansi dan integritas kornea (Rocher et al., 2020).

Pada kondisi patologis tertentu, kadar TGF- β yang menetap dapat berpotensi menimbulkan masalah karena dapat mempertahankan sel-sel myofibroblas yang terus mensekresi protein-protein matriks ekstraseluler dalam kadar yang berlebihan. Situasi ini dapat berujung pada fibrosis jaringan

dan kondisi kekeruhan kornea, yang dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama bahkan setelah myofibroblas tidak lagi terdapat pada lokasi lesi. Efek dari kondisi patologis tersebut terhadap fungsi penglihatan sangat bervariasi, mulai dari fotofobia dan astigmatisme ireguler hingga kebutaan pada beberapa kasus dengan fibrosis kornea yang terletak pada aksis penglihatan (Rocher et al., 2020).



Gambar 2.3 Diagram skematik dari proses penyembuhan luka kornea yang dimediasi oleh TGF-β : (a) Cedera pada kornea mengakibatkan sitokin, TGF-β dan PDGF sel keratosit berdiferensiasi menjadi myofibroblast, (b) Proses penyembuhan lesi kornea selesai kemudian sel-sel myofibroblas mengalami apoptosis, (c) Sel-sel myofibroblas melakukan remodeling matriks ekstraseluler dan muncul neovaskularisasi (Rocher et al., 2020)

2.7 Penatalaksanaan Keratitis Bakterialis

Keratitis bakterialis merupakan salah satu infeksi mata yang dapat berujung pada berbagai komplikasi berat. Tata laksana dibutuhkan sesegera mungkin untuk menghindari kejadian komplikasi. Hingga saat ini, antibiotik topikal masih menjadi terapi lini pertama pada kasus keratitis bakterialis. Dokter yang merawat pasien perlu mempertimbangkan berbagai faktor dalam memilih regimen antibiotik, di antaranya spektrum antibiotik, toksisitas, ketersediaan dan biaya, dan pola resistensi lokal. Selain terapi antibiotik, berbagai terapi adjuvan telah banyak diteliti pada kasus keratitis bakterialis. Tujuan terapi adjuvan pada kasus keratitis bakterialis adalah untuk memperbaiki luaran visual dan anatomis. Beberapa jenis terapi adjuvan yang telah diteliti adalah pemberian *cyanoacrylate glue*, transplantasi membran amnion, inhibitor MMP, mitomycin C, dan *conjunctival flap* (Dakhil et al., 2017).

2.7.1 Sianoakrilat

Sianoakrilat merupakan bentuk ester dari asam sianoakrilat yang digunakan sebagai perekat jaringan pada prosedur penutupan perforasi kornea dengan tujuan untuk mencegah atau menunda prosedur keratoplasti. Sianoakrilat tersedia dalam berbagai bentuk, di antaranya butil-2-sianoakrilat, N-butil-2-sianoakrilat, N-butil-sianoakrilat, dan 2-oktil-sianoakrilat. Selain menyediakan dukungan struktural dan

kemampuan untuk mengatasi perforasi, sianoakrilat juga menghambat enzim kolagenase epitel melalui inhibisi sel-sel PMN dan juga memiliki efek terhadap bakteri. Sianoakrilat memiliki peranan potensial sebagai terapi adjuvan keratitis bakterialis. Sianoakrilat memberikan manfaat dalam hal penutupan luka mata dan stabilisasi perforasi kornea dari etiologi infeksi dan non-infeksi, termasuk *corneal melting* akibat mekanisme imun. Sianoakrilat juga memiliki aktivitas antimikroba terhadap berbagai spesies bakteri (Dakhil et al., 2017).

2.7.2 Transplantasi Membran Amnion

Bagian amnion dari plasenta manusia memiliki sifat anti-inflamasi, anti-fibrosis, anti-angiogenesis, dan anti-bakteri. Membran amnion juga mendukung re-epitelisasi dengan memperkuat perlekatan sel-sel epitelial dan sel basal, induksi migrasi sel-sel epitel, stimulasi diferensiasi dan proliferasi sel-sel progenitor epitel konjungtiva dan limbus, pencegahan apoptosis epitel, dan penurunan apoptosis keratosit. Selain itu, membran amnion juga menurunkan nyeri yang berhubungan dengan defek epitel (Dakhil et al., 2017).

Membran amnion telah digunakan pada berbagai patologi okular, seperti rekonstruksi permukaan konjungtiva (pembedahan pterigium), defek epitelial persisten, dan cedera kimiawi. Manfaat utama membran amnion pada kasus keratitis bakteri ditunjukkan dapat

mendukung penyembuhan luka, seperti defek epitelial yang menetap pasca terapi antibiotik. Membran basalis dari membran amnion terbukti menyerupai membran basalis konjungtiva dan kornea, di mana membran basalis membran amnion bekerja sebagai *scaffold* untuk migrasi sel-sel epitel dan proteksi mekanis terhadap friksi yang terjadi dengan kelopak mata. Selain itu, membran amnion juga mengandung faktor-faktor pertumbuhan seperti TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, *human chorionic growth factor*, *epidermal growth factor* (EGF), dan β -*fibroblast growth factor* (β -FGF), yang mendukung proses diferensiasi epitel dan mencegah apoptosis. Membran amnion juga mengandung kolagen tipe IV, V, dan VII, serta laminin dan fibronectin. Kolagen tipe V membantu sel-sel epitel untuk melekat pada stroma kornea. Laminin membantu adhesi sel-sel epitel dengan stroma, sedangkan fibronectin memiliki peranan dalam memfasilitasi migrasi, adhesi, dan diferensiasi sel-sel epitel (Dakhil et al., 2017).

Beberapa studi telah meneliti efek positif dari membran amnion terhadap penyembuhan luka keratitis bakterialis. Pada seri kasus retrospektif yang melibatkan pasien yang mengalami penyembuhan defek epitel secara cepat pasca penggunaan membran amnion pasca keratitis bakterialis akibat *Pseudomonas*, sebanyak 5 dari 6 pasien terbukti mengalami reepitelisasi dengan cepat, dan satu pasien membutuhkan tindakan evisasi. Studi lainnya menunjukkan

reepitelisasi sempurna pada seluruh subjek dengan keratitis mikroba pasca transplantasi membran amnion (Dakhil et al., 2017; Kheirkhah et al., 2012; Mohan et al., 2014).

2.7.3 Inhibitor Matrix Metalloproteinase

Keratitis bakterialis dapat mengakibatkan penipisan stroma akibat destruksi matriks ekstraseluler oleh enzim protease. *Matrix metalloproteinase* (MMP) merupakan salah satu kelompok enzim protease, yang meliputi enzim kolagenase, gelatinase, dan stromelisin. Inhibisi enzim MMP diperkirakan dapat berguna dalam mencegah destruksi stroma. Inhibitor MMP yang telah diteliti kegunaannya pada kasus keratitis mikroba antara lain tetrasiklin, asetilsistein, askorbat, dan asam natrium etilendiamintetraasetat. Walaupun demikian, belum didapatkan studi RCT yang dilakukan untuk meneliti efektivitas agen-agen tersebut pada jaringan kornea manusia, khususnya pada kasus keratitis bakterialis. Faktanya, walaupun inhibitor MMP telah diajukan sebagai salah satu terapi adjuvan ulkus kornea sejak dekade 1980-an, jumlah studi yang dilakukan untuk meneliti hal tersebut masih sangat terbatas, baik pada model hewan coba maupun pada subjek manusia.

Satu-satunya penelitian mengenai efektivitas inhibitor MMP pada keratitis mikroba adalah penelitian yang menggunakan doksisisiklin. McElvanney *et al.* melaporkan dua kasus keratitis

bakterialis akibat *Pseudomonas* yang ditatalaksana dengan doksisisiklin oral 100 mg dua kali sehari selain pemberian ofloxacin topikal 0,3% dan ceftazidime 5%. Penelitian tersebut membuktikan adanya stabilisasi dari proses *corneal melting* yang terjadi, namun penelitian tersebut tidak turut membuktikan efek yang signifikan dari doksisisiklin.

Walaupun hipotesis dan berbagai data *in vitro* menunjukkan bahwa inhibitor MMP memiliki manfaat yang menguntungkan pada kasus keratitis bakterialis, penelitian RCT dengan skala studi yang besar perlu dilakukan untuk membuktikan manfaatnya tersebut.

2.7.4 Krioterapi

Hingga saat ini, krioterapi masih digunakan pada berbagai kelainan oftalmologi, seperti neoplasma skuamosa permukaan mata, *retinopathy of prematurity*, trauma retina, kutil kelopak mata, dan glaukoma. Krioterapi menghasilkan stimulus yang mengakibatkan penurunan suhu lokal dan metabolisme jaringan secara tiba-tiba, yang mengakibatkan kematian bakteri dan aktivasi respons imun (Dakhil et al., 2017).

Krioterapi merupakan terapi bakterisidal yang terbukti efektif pada studi eksperimental dengan hewan coba babi dan kelinci yang diinduksi keratitis *Pseudomonas*, baik monoterapi maupun dikombinasi dengan antibiotik topikal. Eiferman *et al.* melaporkan tiga kasus

keratitis kornea akibat *Pseudomonas* dengan perforasi hingga sklera yang dilakukan keratoplasti dan krioterapi pada kornea dan sklera. Seluruh kasus menunjukkan perbaikan yang signifikan (Dakhil et al., 2017).

Berdasarkan studi pada hewan, krioterapi memiliki manfaat yang potensial pada kasus keratitis bakterialis yang berekstensi hingga sklera. Penelitian lebih lanjut mengenai krioterapi pada sklera masih diperlukan sebelum menarik kesimpulan terkait efektivitas dan keamanannya pada kornea manusia, khususnya terkait cedera endotel (Dakhil et al., 2017). Pada studi lain yang dilaporkan Dwita *et al* menyebutkan bahwa tidak terdapat perbedaan ekspresi TGF- β 1 dan MMP-9 yang signifikan setelah krioterapi (Permatasari et al., 2021).

2.7.5 Conjunctival Flap

Beberapa peneliti menganggap *conjunctival flap* sebagai tambalan biologis (*biological patch*) karena sifat protektif, tropik, dan analgesiknya. Penggunaan *conjunctival flap* sebagai modalitas tata laksana kelainan kornea pertama kali dilaporkan oleh Gundersen. Studi lainnya pada 37 subjek dengan perforasi kornea sentral dan eksentrik dengan diameter < 4 mm dengan/tanpa disertai prolaps iris menunjukkan bahwa *conjunctival flap* dapat menghindari prosedur *penetrating keratoplasty* di kemudian hari. Studi tersebut juga

menunjukkan bahwa luaran *conjunctival flap* dipengaruhi oleh lokasi, situs perforasi, dan adanya perubahan lensa yang bersifat *cataractous*. Sebuah seri kasus retrospektif menunjukkan bahwa 94% pasien ulkus kornea kronis berhasil menerima *conjunctival flap* dengan kondisi stabil hingga dua tahun pasca prosedur. Sebanyak 61% pasien menjalani prosedur *corneal graft* dalam 6-24 bulan pasca operasi.

Conjunctival flap dianggap sebagai salah satu metode tertua untuk menatalaksana perforasi kornea ketika akses terhadap *corneal graft* tidak memungkinkan. Studi lebih lanjut diperlukan untuk memvalidasi peranan *conjunctival flap* sebagai tata laksana sebelum keratoplasti pada kasus keratitis bakterialis.

2.8 Potensi Membran *Platelet-Rich Fibrin* pada Keratitis Bakterialis

Dewasa ini, berbagai jenis konsentrat trombosit telah digunakan untuk mempercepat proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan pada era kedokteran regeneratif modern. Trombosit terbukti berperan pada proses homeostasis, angiogenesis, inflamasi, dan regenerasi jaringan. Trombosit merepresentasikan sumber autolog dari lebih dari 1500 faktor bioaktif, yang meliputi faktor pertumbuhan, *messenger* sistem imun, dan enzim, yang memiliki peranan penting pada proses perbaikan jaringan dan penyembuhan luka. Kemampuan konsentrat trombosit untuk menyediakan faktor

pertumbuhan pada dosis 6-8 kali lebih tinggi dari dosis fisiologis tubuh merepresentasikan mekanisme konsentrat trombosit untuk menstimulasi penyembuhan luka. Selain itu, faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh trombosit untuk menstimulasi diferensiasi sel-sel punca mesenkimal serta sel-sel target lainnya juga merupakan salah satu mekanisme yang terlibat pada proses penyembuhan (Mihaylova et al., 2017; Pavlovic et al., 2016).

Pasca dibuktikannya kemampuan trombosit dalam mendukung regenerasi jaringan, konsentrat trombosit telah digunakan selama lebih dari dua dekade pada bidang kedokteran regeneratif. *Platelet-rich plasma* (PRP) merupakan konsentrat autolog dari trombosit manusia di dalam plasma yang menjalani sentrifugasi untuk mendapatkan kadar suprafisiologis dari faktor pertumbuhan. Protokol PRP membutuhkan beberapa tahapan sentrifugasi, penambahan antikoagulan non-autolog, serta penambahan thrombin sapi atau kalsium klorida (Pavlovic et al., 2021). Pada bidang maksilofasial, di laporkan pada penelitian hewan coba kelinci, PRP digunakan dalam penyembuhan tulang, melalui *bone graft* yang dipasang pada tulang maksila, dengan kandungan banyak trombosit dapat membantu penyembuhan tulang dengan meningkatkan kepadatan osteoblas pada cangkong tulang maksila (Utomo et al., 2019).

Kadar normal trombosit pada manusia bervariasi antara 150.000 hingga 350.000 sel/ μ L plasma. Jumlah trombosit di dalam PRP secara umum bergantung pada protokol pembuatan PRP yang digunakan, namun secara

umum didapatkan 2–5 kali lipat lebih tinggi daripada kadar fisiologis trombosit di dalam darah manusia. Umumnya, bekuan PRP mengandung 95% trombosit, 4% eritrosit, dan 1% leukosit. Konsentrat platelet bertanggung jawab terhadap sekresi faktor pertumbuhan secara aktif dan induksi rekrutmen, proliferasi, dan diferensiasi dari berbagai jenis sel yang terlibat di dalam proses regenerasi jaringan. Setelah diproduksi, PRP autolog dapat mempertahankan stabilitasnya selama 8 jam terhadap reaksi imunogenik dan kelainan-kelainan infeksi. Pasca aktivasi PRP, trombosit mulai melepaskan faktor-faktor pertumbuhan dalam 10 menit pertama. Sebanyak 95% dari faktor pertumbuhan yang terkandung di dalam PRP dilepaskan dalam satu jam pasca aktivasi PRP, yang mengindikasikan bahwa PRP perlu diberikan dalam 10 menit pertama pasca aktivasi. Walaupun demikian, dalam satu dekade terakhir, beberapa keterbatasan PRP telah dilaporkan pada berbagai studi. Protokol preparasi PRP membutuhkan penambahan antikoagulan yang mengganggu proses penyembuhan luka, di mana antikoagulan tersebut mencegah proses koagulasi dan pembentukan bekuan fibrin. Selain itu, reaksi terhadap thrombin sapi dan antibodi terhadap faktor Va sapi dapat menyebabkan koagulopati dan kelainan perdarahan pasca pemberian PRP. Periode pelepasan faktor pertumbuhan yang sangat singkat serta tidak adanya keseragaman dalam protokol preparasi PRP menjadi alasan dari para peneliti untuk mengembangkan konsentrat trombosit yang baru untuk mengatasi keterbatasan dari PRP.

Sehubungan dengan pembatasan terkait replantasi produk-produk turunan darah, *platelet-rich fibrin* (PRF) pertama kali dikenalkan di Prancis oleh Choukron *et al.* pada tahun 2001. Konsentrat trombosit generasi kedua ini didefinisikan sebagai trombosit autolog dan biomaterial fibrin yang kaya akan leukosit, yang pemberiannya bertujuan untuk mengakumulasi platelet, menstimulasi sistem imun, dan melepaskan sitokin-sitokin di dalam bekuan fibrin. Karena protokol preparasi PRF tidak membutuhkan penambahan antikoagulan, kaskade penyembuhan luka tidak dihambat oleh antikoagulan dan pembentukan bekuan terjadi secara alamiah. Penambahan thrombin, kalsium klorida, atau agen-agen aktivator lainnya juga tidak dibutuhkan pada preparasi PRF, sehingga dapat mencegah risiko yang berkaitan dengan penggunaan thrombin. PRF juga memiliki beberapa kelebihan dibandingkan PRP (ditunjukkan pada Tabel 2.2), termasuk mengandung kadar leukosit tinggi yang tidak hanya berperan pada proses imunitas dan anti-bakteri, namun juga mendukung proses penyembuhan luka. PRF membentuk jaringan kaya fibrin (*dense fibrin network*) yang memungkinkan laju degradasi yang lebih lambat sehingga dapat memperlambat pelepasan faktor pertumbuhan menuju jaringan di sekitar luka selama proses penyembuhan luka. Pelepasan faktor pertumbuhan dari PRF telah dilaporkan dapat berlangsung hingga 7 hari untuk sebagian besar jenis PRF, bahkan bisa berlangsung lebih lama pada jenis PRF tertentu. Selain itu, kelebihan dari PRF dibandingkan PRP adalah protokol produksinya yang standar, biaya yang lebih terjangkau, serta metode produksi yang lebih

sederhana. Secara singkat, sampel darah tanpa penambahan antikoagulan dikumpulkan di dalam tabung 10 mL, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2.700 hingga 3.000 rpm selama 10–12 menit. Pasca sentrifugasi, eritrosit terletak di bawah tabung, di mana *platelet-poor plasma* (PPP) terletak di atas tabung sentrifugasi. Bekuan PRP, yang meliputi trombosit, leukosit, dan faktor pertumbuhan, terletak di antara lapisan PPP dan eritrosit di bagian tengah tabung. Prinsip pengambilan PRF adalah memungkinkan terjadinya aktivasi trombosit dan polimerisasi fibrin secara fisiologis. Aktivasi trombosit terjadi sesaat setelah kontak dengan dinding tabung sentrifugasi dan mengakibatkan terbentuknya *dense fibrin network* dan bekuan PRF yang dapat digunakan. Dengan demikian, periode pengambilan sampel darah hingga pemindahan sampel darah ke dalam tabung sentrifugasi perlu dilakukan sesegera mungkin, sebaiknya dilakukan dalam waktu 2 menit 30 detik. Apabila periode tersebut terjadi lebih lama, polimerisasi fibrin dapat terjadi secara difus dan PRF tidak dapat digunakan (Pavlovic et al., 2021).

Tabel 2.2 Kelebihan dan kekurangan PRF (Pavlovic et al., 2021)

Kelebihan PRF	Kekurangan PRF
Merupakan produk autolog sepenuhnya	Kesuksesan preparasi PRF sangat bergantung pada kecepatan <i>blood handling</i>
Manipulasi plasma yang minimal tanpa penambahan agen biokimia	Membran PRF harus digunakan sesegera mungkin, karena integritas struktural dari

	PRF berubah seiring dengan berjalannya waktu
Tidak membutuhkan thrombin karena polimerisasi terjadi secara alamiah	Penyimpanan membran PRF tidak memungkinkan akibat adanya potensi kontaminasi bakteri dan dehidrasi
Matriks fibrin PRF mengandung faktor-faktor pertumbuhan, leukosit, dan sitokin yang terlibat di dalam proses penyembuhan luka	Sehubungan dengan sifat autolognya, kuantitas PRF relatif rendah dan tidak memungkinkan untuk digunakan di dalam prosedur pembedahan umum
Pelepasan faktor pertumbuhan terjadi dalam periode yang lebih panjang dibandingkan konsentrat trombosit lainnya	
Membran PRF memiliki fleksibilitas dan elastisitas yang tinggi	
Biaya yang terjangkau dan metode preparasi yang sederhana, hanya membutuhkan satu tahap sentrifugasi	

Analisis komposisi PRF menunjukkan bahwa PRF terdiri dari bekuan fibrin yang diperkaya dengan trombosit, leukosit, sitokin, dan sel-sel punca. Walaupun trombosit dan leukosit merupakan sel-sel utama yang berperan terhadap aktivitas biologis dari PRF, matriks fibrin memiliki peranan yang penting terhadap efek terapeutik dari PRF. Konversi fibrinogen yang bersifat *soluble* menjadi fibrin yang bersifat *insoluble* terjadi dengan adanya thrombin di dalam sampel darah. Proses polimerisasi secara signifikan mempengaruhi karakteristik biologis dari produk akhir matriks fibrin. Selama proses preparasi

PRP, pemberian thrombin dan kalsium klorida memungkinkan polimerisasi fibrin secara tiba-tiba. Sebaliknya, pemrosesan PRF mengakibatkan polimerisasi alamiah dengan laju yang lambat dari fibrin, akibat adanya thrombin dalam kadar yang fisiologis di dalam sampel darah. Polimerisasi fibrin dapat terjadi melalui dua proses, yaitu *bilateral junction* dan *equilateral junction*. Kadar thrombin yang tinggi pada saat preparasi PRP menginduksi pembentukan *bilateral junction* dan pembentukan jaringan fibrin yang kaku. Polimerisasi yang terjadi secara tiba-tiba ini memungkinkan pemerangkapan faktor-faktor pertumbuhan dan sitokin secara ekstrinsik di dalam suspensi koloid yang terdapat di antara jaringan fibrin, dan dilepaskan secara masif dalam satu jam pertama. Di sisi lain, *equilateral junction* dan matriks fibrin yang bersifat fleksibel terbentuk ketika thrombin ada pada kadar yang rendah, khususnya selama pemrosesan PRF. Polimerisasi fibrin yang terjadi secara lambat memungkinkan pemerangkapan sitokin dalam kadar yang lebih tinggi di dalam matriks fibrin. Molekul-molekul ini hanya akan digunakan ketika terjadi remodeling matriks dan ketika molekul-molekul sitokin tersebut dilepaskan secara perlahan, sehingga didapatkan efek sitokin jangka panjang pada lokasi luka.

Trombosit, sebagai komponen dominan dari PRF, merupakan sel-sel yang memiliki peranan utama dalam aktivitas biologis dari PRF. Walaupun sel-sel ini memiliki peranan utama dalam pembentukan bekuan darah, trombosit juga mengandung molekul-molekul protein yang terlibat di dalam kaskade

persinyalan pada proses penyembuhan luka. Substansi-substansi ini disimpan di dalam tiga jenis granul, yaitu granul alfa, beta, dan lambda, yang terletak di dalam trombosit. Granul alfa merupakan reservoir faktor pertumbuhan yang utama dan merupakan granul trombosit dengan kadar yang paling banyak. Granul-granul ini mengandung berbagai faktor pertumbuhan yang bertanggung jawab terhadap regenerasi jaringan lunak dan keras pasca cedera, yang dilepaskan melalui proses eksositosis ketika terjadi aktivasi trombosit. Beberapa faktor pertumbuhan yang terkandung di dalam PRF ditampilkan pada Tabel 2.3, yang meliputi TGF- β , *platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan *epidermal growth factor* (EGF). Selain itu, di antara faktor-faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh trombosit, PRF juga mengandung berbagai sitokin seperti IL-1, IL-6, IL-4, dan TNF- α .

Tabel 2.3 Beberapa faktor pertumbuhan dan sitokin yang terdapat di dalam PRF beserta fungsinya

Faktor pertumbuhan/sitokin	Fungsi
TGF- β	Menstimulasi angiogenesis, fibronectin, dan produksi kolagen; mencegah degradasi kolagen; menginduksi kemotaksis fibroblas dan sel-sel imun; menghambat pembentukan osteoklas dan degenerasi tulang

PDGF	Menstimulasi migrasi dan proliferasi sel-sel mesenkimal; memungkinkan angiogenesis, kemotaksis dan aktivasi makrofag; menginduksi sekresi TGF- β dari makrofag
IGF-1	Menstimulasi kemotaksis dan aktivasi osteoblas serta pembentukan tulang; menginduksi diferensiasi dan mitogenesis sel-sel mesenkimal
VEGF	Menginisiasi angiogenesis; meningkatkan permeabilitas pembuluh darah; menginduksi proliferasi dan migrasi sel-sel endotel
EGF	Mendukung angiogenesis; menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel-sel epitel; meningkatkan sekresi sitokin di dalam sel-sel epitel dan mesenkimal
IL-1 β	Meningkatkan ekspresi molekul-molekul adhesif pada sel-sel endotel; menstimulasi sel T- <i>helper</i> , kemotaksis limfosit; mengaktifasi sel-sel osteoblas.
IL-6	Menstimulasi diferensiasi sel B dan sekresi antibodi; menginduksi diferensiasi sel-sel T <i>naïve</i> menjadi sel-sel T sitotoksik
TNF- α	Menginduksi sitotoksitas neutrofil; menstimulasi <i>survival</i> dan proliferasi sel; meningkatkan kemampuan remodeling dari fibroblast
IL-4	Menginduksi diferensiasi sel B menjadi plasmosit, <i>class switching</i> sel B menjadi IgE, dan diferensiasi sel-sel T- <i>helper naïve</i> menjadi sel-sel Th2

Studi menunjukkan bahwa bersama dengan kadar trombosit dan faktor-faktor pertumbuhan yang tinggi, PRF juga diperkaya dengan leukosit dan berbagai jenis sitokin. Temuan tersebut memiliki nilai ilmiah yang tinggi karena leukosit merupakan regulator utama dari regenerasi tulang dan jaringan lunak, dengan melepaskan faktor-faktor limfogenik yang bertanggung jawab terhadap proses *cross talk* seluler pada regenerasi jaringan. Sejalan dengan hasil

studi tersebut, studi terbaru juga menunjukkan bahwa penurunan gaya sentrifugasi pada preparasi PRF berhubungan dengan peningkatan total kadar trombosit, leukosit, dan faktor pertumbuhan, yang mengindikasikan bahwa konsep *low-speed centrifugation* menyebabkan peningkatan potensi regenerasi dari PRF. Fibrin dan *fibrin degradation products* menstimulasi migrasi dan aktivasi neutrofil, serta pelepasan enzim-enzim protease oleh neutrofil. Neutrofil-neutrofil ini mengeliminasi bakteri kontaminan melalui pembentukan radikal oksidatif. Selain itu, interaksi fibrin dengan monosit dan makrofag juga turut mempengaruhi fagositosis, yang menunjukkan bahwa makrofag memiliki peranan penting dalam proses transisi antara proses inflamasi dan perbaikan jaringan. Tanpa leukosit, komunikasi antar sel yang akurat untuk regenerasi jaringan tidak dapat terjadi, yang mengindikasikan bahwa peran regenerasi jaringan tidak hanya dimainkan oleh trombosit, namun regenerasi jaringan juga membutuhkan peranan dari leukosit (Pavlovic et al., 2021).

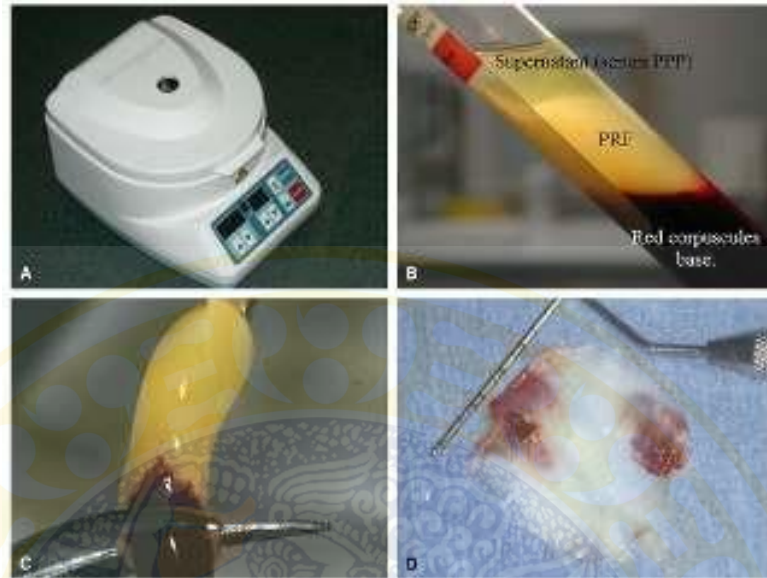
Penggunaan membran PRF telah diaplikasikan pada berbagai bidang kedokteran seperti bedah mulut, telinga, hidung, dan tenggorokan, bedah ortopaedi, bedah plastik, termasuk dalam bidang oftalmologi. Can *et al.* (2016) melaporkan penggunaan *graft* membran PRF pada tiga pasien dengan *corneal stromal melting* derajat berat serta desemetokel sentral yang diakibatkan oleh keratopati neurotropik dan keratitis infeksi. Pada pasien dengan keratitis infeksi, *graft* membran PRF satu lapis diaplikasikan dengan *therapeutic bandage contact lens* (TBCL) di samping penggunaan obat-obatan topikal, di

antaranya moxifloxacin, fluorometholone, natrium hialuronat, dan tetrasiklin. Pada *follow-up* satu hari pasca operasi, membran PRF terbukti berhasil mengisi ulkus kornea dan menyatu dengan jaringan kornea. Pemberian membran PRF juga terbukti menurunkan intensitas nyeri dan injeksi konjungtiva. Pada periode *follow-up* tiga bulan pasca operasi, kornea didapatkan mengalami penebalan tanpa transparansi, dan pada periode *follow-up* satu tahun pasca operasi, tidak didapatkan rekurensi atau penurunan fungsi kornea (Can et al., 2016).

Arsitektur fibrin secara tiga dimensi dari membran PRF terdiri dari konsentrat trombosit autolog, berbagai protein matriks seperti thrombospondin-1, fibronectin, dan vitronectin, serta leukosit, sehingga membuat membran PRF cocok diaplikasikan dalam bidang *tissue engineering* sebagai *scaffold*. Akibat adanya degranulasi trombosit dan degradasi matriks, faktor-faktor pertumbuhan yang dilepaskan secara lambat seperti PDGF, TGF- β , FGF, IGF-1 dan IGF-2, VEGF, dan EGF turut meregulasi interaksi seluler dan mempercepat sintesis matriks untuk mendukung penyembuhan jaringan. Studi Can et al. (2016) membuktikan bahwa membran PRF dapat digunakan sebagai biomaterial alternatif untuk tujuan penyembuhan kornea. Studi lainnya melaporkan metode alternatif terbaru untuk kasus perforasi kornea, yaitu kombinasi penggunaan *graft* membran fibrin autolog dengan bekuan PRP. Pada studi tersebut, bekuan PRP diletakkan pada regio kornea yang mengalami perforasi sebagai *plug* untuk mencegah hubungan antara jaringan intraokular dengan lingkungan luar. Selanjutnya, membran fibrin autolog diaplikasikan

pada jaringan konjungtiva di sekitarnya untuk menutupi seluruh permukaan kornea dan bekuan PRP. Prosedur preparasi membran fibrin autolog terbilang sangat kompleks dan meliputi *platelet-poor plasma*, thrombin autolog, kalsium klorida, kondisi-kondisi spesifik, serta *laminar flow hood*, dan membutuhkan waktu sekitar 1,5 hingga 3 jam. Sebaliknya, membran PRF dapat diproduksi dengan lebih mudah dan cepat menggunakan metode sederhana, yang hanya membutuhkan tabung darah tanpa antikoagulan, sistem sentrifugasi, dan waktu 15 menit sebelum prosedur operasi. Preparasi membran PRF juga bebas dari substansi-substansi kimiawi yang berpotensi mengakibatkan efek samping lokal dan/atau sistemik (Can et al., 2016).

Walaupun membran PRF memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan PRP, terdapat kekhawatiran bahwa membran PRF dapat mencetuskan respons inflamasi berlebihan yang berasal dari mediator-mediator pre-inflamasi, lisosom, serta turunan-turunan kolagen atau litik lainnya yang berada di dalam leukosit, walaupun leukosit berada di dalam membran PRF dalam jumlah yang relatif rendah. Namun demikian, Choukroun *et al.* menunjukkan bahwa membran PRF bertindak sebagai adjuvan anti-inflamasi pada saat prosedur operasi sehubungan dengan kemampuan retrokontrol inflamasi yang dimilikinya (Can et al., 2016).



Gambar 2.4 Proses pembuatan PRF; A. Alat untuk proses sentrifugasi; B. Proses sentrifugasi mengakibatkan komposisi dari clot fibron di tengah tabung, antara sel darah merah di bawah dan poor platelet serum di atas; C. Clot PRF, setelah pengambilan PRF dari tabung; D. Membran PRF setelah proses kompresi. (Dohan et al., 2006)

2.9 Kelinci Putih New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*)

New Zealand White Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) merupakan hewan coba yang sering digunakan pada penelitian *in vivo*. Anatomi mata kelinci yang mirip dengan manusia menjadikan kelinci sebagai salah satu model hewan coba yang ideal untuk penelitian di bidang mata. Ukuran mata kelinci relatif besar dan bervariasi, Saat lahir berukuran sekitar 6 mm namun tumbuh sangat cepat hingga pada 7 - 10 hari pasca kelahiran kira-kira mencapai 2/3 ukuran mata kelinci dewasa. Kompresi tampak pada diameter antero-posteriornya (16 - 19 mm) sementara diameter ekuator kira-kira 18 mm. Hal ini sedikit berbeda dengan mata manusia yang relatif bulat. Kelinci memiliki cara yang sama dalam mengubah kekuatan akomodasi, namun

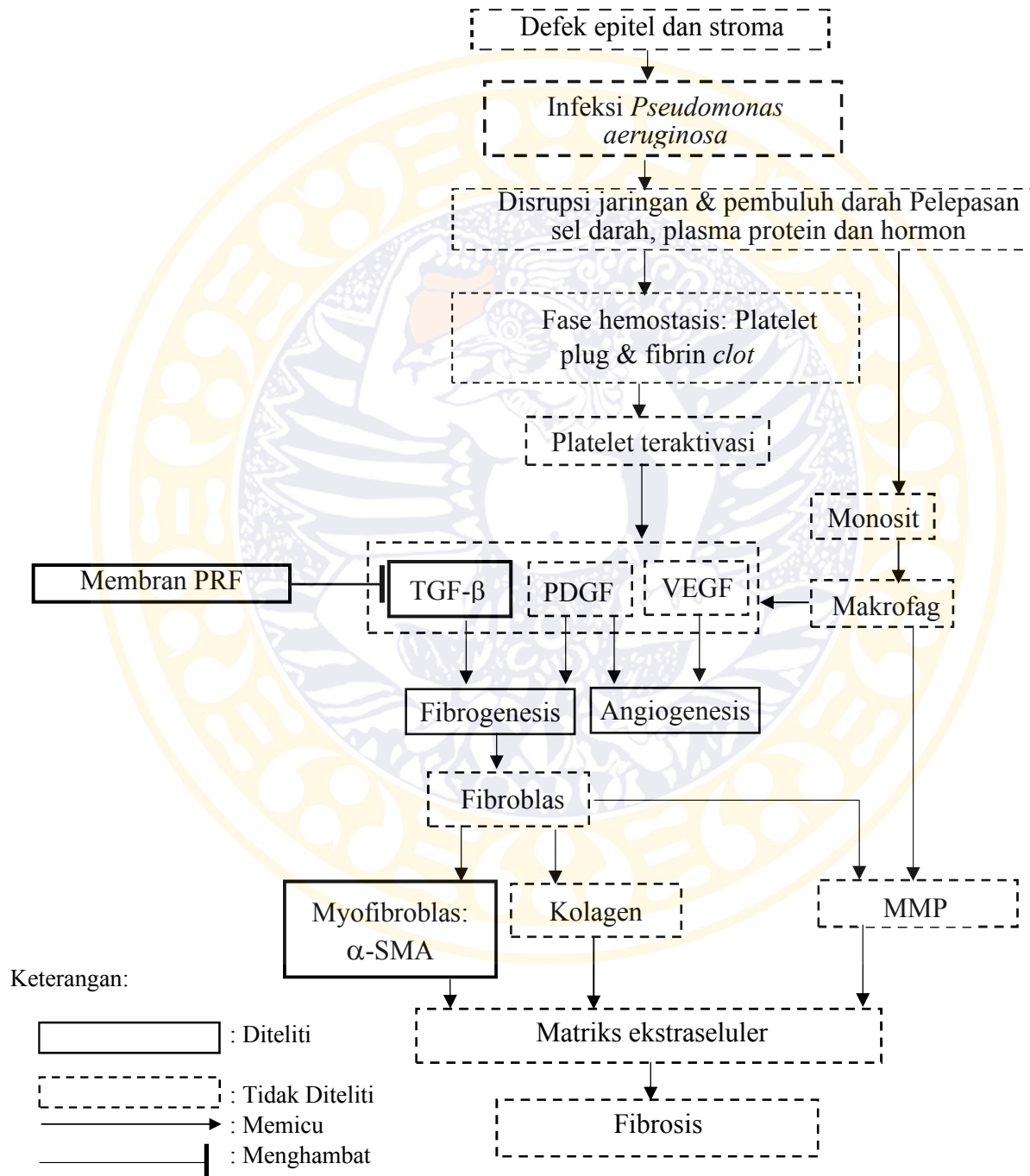
kapasitasnya jauh lebih rendah daripada manusia. Daya akomodatif mata kelinci berkisar dari 0 - 2,5 D, dengan rata-rata 1,5 D (Gray, B., Huang, L. C., Garufis, C., Gwon, A. and Martiz, 2010). Kornea kelinci sangat menonjol dan lebar, mentransmisikan hampir 100% cahaya dalam spektrum yang terlihat, tidak melingkar dan memiliki diameter horizontal rata-rata 15 mm dan diameter vertikal rata-rata 13,5-14,0 mm. Jari-jari kelengkungan pada umumnya berkisar antara 7,0-7,5 mm, namun bervariasi berdasarkan umur dan ukuran kelinci, dan dapat berubah selama 15 bulan pertama kehidupan. Saat lahir memiliki kekuatan 60 D, menurun sampai 50 D pada 30 minggu, dan stabil pada usia 60-80 minggu dengan 40 - 43 D. Ketebalan kornea kelinci sekitar 0,3-0,4 mm di sentral dan 0,45 mm di perifer. Epitel kornea kelinci lebih tipis dari pada manusia, kira-kira 30 - 40 μm ketebalannya. Epitel terdiri dari deretan sel basal kolumnar di bawah 2 baris poligonal dan sampai 6 baris sel berbentuk dan sel skuamosa di permukaan luar. Membran basal epitel berlanjut dengan epitel konjungtiva. Tidak jelas apakah ada lapisan Bowman diantara epitel dan stromanya. Lapisan antara epitel dan stroma sangat tipis (1-2 μm) sehingga dianggap sebagai zona modifikasi stroma anterior. Stroma kornea kelinci memiliki tebal kira-kira 0,24 mm dan terdiri dari lamella fibril kolagen dari 20 - 30 μm yang saling terjalin satu sama lain. Serabut elastis dan sel stroma memanjang di antara lamella. Lapisan descemet memiliki tebal 7-8 μm dan menebal seiring bertambahnya usia hingga 15-22 μm pada kelinci dewasa. Lapisan endotel terdiri dari satu lapisan sel heksagonal atau poligonal

rata dengan diameter 20 μm (kira-kira 3.200/mm²) dan tebal 3-5 μm . Sementara sel-sel endotel berdiameter 20 μm pada kelinci dewasa. Pada kelinci muda, aktivitas mitosis terjadi secara tidak teratur saat mitosis endotel. Sedangkan pada endotel kelinci dewasa aktivitas amitotik terjadi setelah cedera. Setelah terjadi luka endotel, aktifitas amitotik terjadi lebih dini dibanding aktifitas mitosis yang terjadi setelah 24 jam dan terjadi intensif di sekitar area luka selama 48 - 55 jam berikutnya (Gray, B., Huang, L. C., Garufis, C., Gwon, A. and Martiz, 2010).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Adanya defek pada epitel kornea menyebabkan resiko infeksi bakteri patogen yang ada di luar mata untuk berkembang, termasuk pada *Pseudomonas aeruginosa* dimana merupakan patogen oportunistik yang dapat menginfeksi kornea hanya bila terdapat defek pada epitel. Terdapat defek pada kornea menyebabkan terjadinya disrupsi jaringan dan pembuluh darah. Akibatnya terjadi pelepasan sel darah, protein plasma (fibrinogen, fibronectin dan plasminogen) dan hormon-hormon. Selanjutnya terjadi kaskade hemostasis dan teraktivasinya platelet. Platelet yang teraktivasi melepaskan banyak faktor pertumbuhan seperti PDGF, VEGF, dan sitokin yang kuat seperti TGF- β , dan interleukin-interleukin. Pelepasan faktor pertumbuhan memicu migrasi dan proliferasi sel pada area luka. Fase inflamasi, ditandai dengan influs dari neutrofil, monosit, dan sel-sel inflamasi lainnya ke area luka. Sel fagosit, seperti neutofil dan monosit, mengeluarkan enzim proteolitik dan mendorong proses *debridement* jaringan. Selanjutnya neutrofil dan makrofag yang teraktivasi akan menginduksi faktor pertumbuhan dan sitokin yang menstimulasi proses fibrogenesis dan angiogenesis.

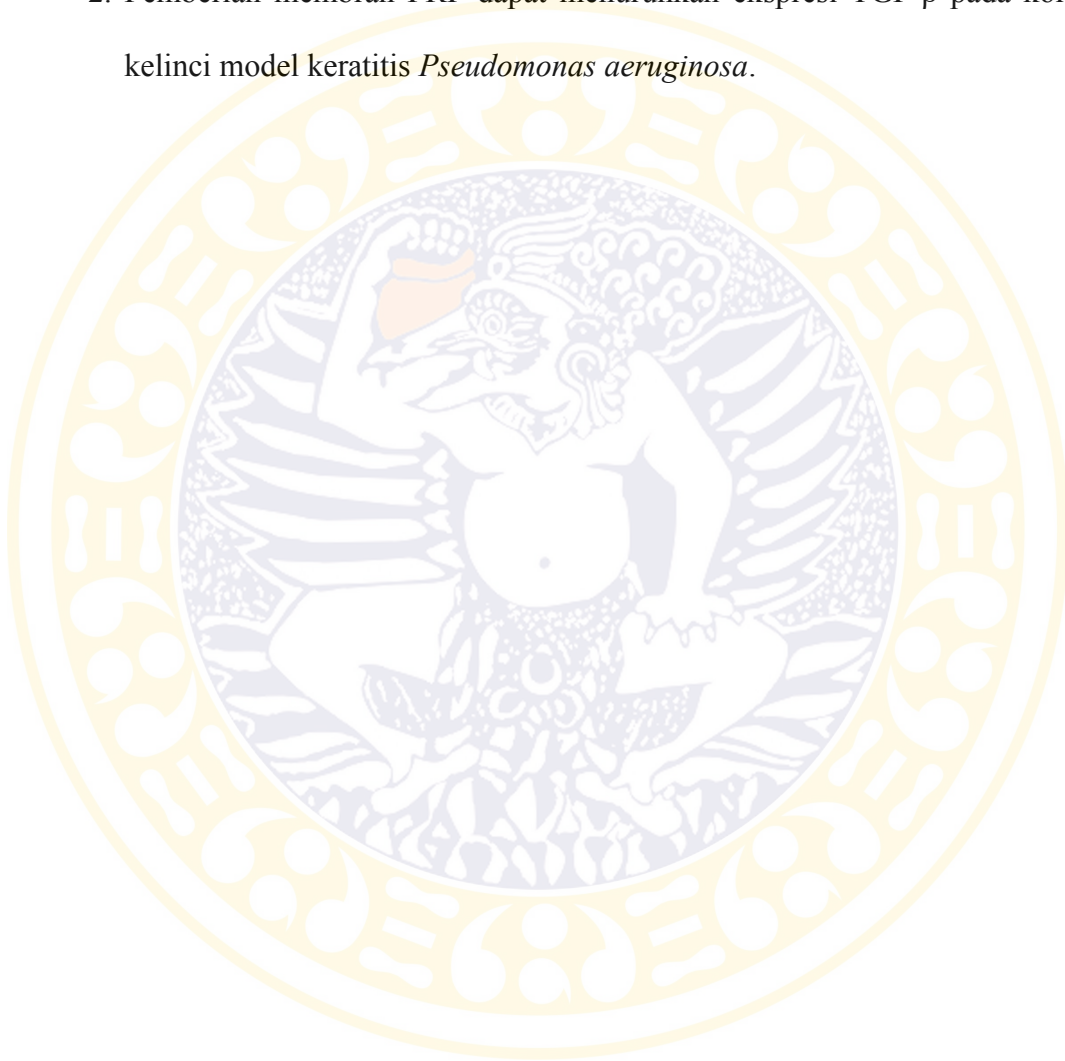
Selanjutnya adalah fase proliferasi yang dicirikan dengan hiperseluleritas pada jaringan, utamanya fibroblas, dan peningkatan aktivitas fibroblas. Dua proses inti dari fase proliferasi adalah angiogenesis, dan fibrogenesis. Proses fibrinogenesis didominasi dengan peningkatan sel fibroblas yang merupakan proses sintesis kolagen tipe I dan III atau jaringan ikat longgar.

PDGF dan TGF- β disekresikan oleh platelet dan makrofag teraktivasi, merupakan kunci utama terjadinya fibrosis pada proses penyembuhan luka. Sedangkan VEGF mendorong pembentukan vaskular baru. PDGF dan TGF- β , saling bergantian, berperan sebagai autokrin pada fibroblas untuk menstimulasi proliferasi, migrasi dan produksi kolagen. Di bawah stimulasi TGF- β , fibroblas juga berdiferensiasi menjadi myofibroblas, yang terekspresi oleh antibodi *α -smooth muscle actin* (α -SMA) intraseluler. Kolagen dan myofibroblas merupakan beberapa komponen yang membentuk matriks ekstraseluler. α -SMA berperan dalam proses remodeling kornea dan memicu deposisi kolagen, yang akan berujung pada fibrosis dan pembentukan fibrosis kornea, serta myofibroblas berperan dalam memfasilitasi kontraktur dan penutupan luka.

Membran PRF merupakan matriks fibrin yang terpolimerisasi secara alami yang mempunyai elemen molekular dan seluler yang mampu membantu dalam proses penyembuhan, yang terdiri dari gabungan platelet, leukosit, sitokin dan juga *circulating stem cells*. Faktor-faktor pertumbuhan tersebut berperan penting dalam regenerasi jaringan. Selain dapat mengoptimalkan dan mempercepat penyembuhan luka, membran PRF juga bersifat antifibrotik, di mana membran PRF dapat mencegah pembentukan fibrosis dengan cara memodifikasi ekspresi TGF- β serta menekan laju diferensiasi sel-sel keratinosit menjadi myofibroblas, sehingga dapat menekan laju fibrosis kornea.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian membran PRF dapat menurunkan ekspresi α -SMA pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Pemberian membran PRF dapat menurunkan ekspresi TGF- β pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

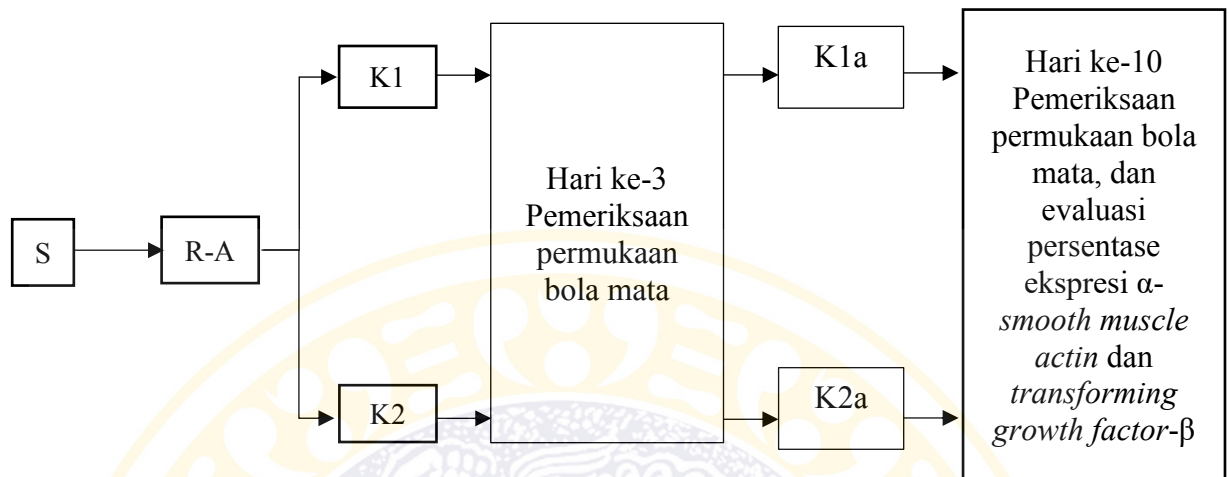
4.1.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah suatu penelitian eksperimental *in vivo* dengan desain penelitian menggunakan *randomized posttest only control group design* dengan menggunakan hewan coba kelinci putih *New Zealand (Oryctolagus cuniculus)* yang diinduksi dengan goresan epitel kornea lalu penetasan suspensi yang mengandung *P. aeruginosa* menjadi hewan model keratitis bakterial. *Platelet rich fibrin* (PRF) diproses dari sampel darah masing-masing model hewan. Hewan model keratitis akan dibagi menjadi 2 (dua) kelompok, yaitu kelinci dengan keratitis *Pseudomonas aeruginosa* yang diberikan terapi levofloxacin sebagai kelompok kontrol dan kelinci dengan keratitis *Pseudomonas aeruginosa* yang diberikan terapi levofloxacin serta dilakukan penjahitan graft PRF secara bersamaan sebagai kelompok perlakuan. Selanjutnya dibandingkan ekspresi α -SMA dan TGF- β antar kedua kelompok tersebut.

4.1.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh membran PRF (*platelet rich fibrin*) terhadap ekspresi α -SMA dan TGF- β dalam proses penyembuhan luka pada

keratitis bakterial. Adapun rancangan penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

S : subjek penelitian dilakukan induksi keratitis *Pseudomonas aeruginosa* pada hari ke-1

R-A : random alokasi

K1 : kelompok kelinci kontrol dengan tetes mata antibiotik hari ke-3

K2 : kelompok kelinci perlakuan dengan tetes mata antibiotik dan penjahitan graft PRF hari ke-3

K1a : kelompok kelinci kontrol dengan tetes mata antibiotik hari ke-10

K2a : kelompok kelinci perlakuan dengan tetes mata antibiotik dan penjahitan graft PRF hari ke-10

Gambar 4.1 menunjukkan alur penelitian yang akan dilakukan.

Populasi kelinci yang memenuhi kriteria inklusi diinduksi menjadi hewan coba keratitis bakterial dengan membuat goresan pada epitel

kornea lalu penetasan suspensi yang mengandung bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hewan coba akan dilakukan observasi tanpa pemberian antibiotik atau perlakuan lain selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan random alokasi hewan coba menjadi dua kelompok yaitu K1 dan K2. Pada hewan coba dilakukan pemeriksaan permukaan bola mata pada hari pertama yaitu sebelum dilakukan induksi keratitis *Pseudomonas aeruginosa* dan pada hari ketiga. Pemberian perlakuan dilakukan pada hari ketiga yaitu 48 jam setelah induksi keratitis bakterial. Kelompok K1 diberikan tetes mata antibiotik saja sedangkan kelompok K2 diberikan tetes mata antibiotik dan penjahitan membran PRF. Penjahitan membran PRF pada hewan coba dilakukan 24 jam setelah penetasan antibiotik, yaitu pada hari keempat. Penetasan antibiotik topikal sebelum penjahitan membran PRF diharapkan dapat mengurangi jumlah *Pseudomonas aeruginosa* secara lebih efektif pada permukaan bola mata tanpa terhalang membran PRF (Kim et al., 2007). Pada hari ke-3 dan ke-10, dilakukan pemeriksaan kondisi permukaan bola mata meliputi jumlah dan lokasi neovaskularisasi kornea. Pada hari ke-10 dilakukan terminasi hewan coba dan enukleasi untuk pemeriksaan ekspresi α -SMA dan TGF- β dengan imunohistokimia. Terminasi di hari ke-10 atau tujuh hari setelah defek epitel terbentuk akibat keratitis, kemudian semua data hasil pemeriksaan akan dilakukan analisis statistik.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian akan dilakukan pada bulan Mei 2022 - Juni 2022.

4.3. Sampel Penelitian dan Replikasi

4.3.1. Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah bola mata kelinci putih New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) yang terpilih dan memenuhi kriteria inklusi.

4.3.2. Replikasi

Banyaknya sampel untuk replikasi diperkirakan dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$n = \frac{2 \left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta} \right) \cdot \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Keterangan:

n : banyaknya sampel tiap kelompok

σ : simpangan baku derajat fibrosis = 0,72 (Mahmoudzadeh et al., 2020)

$\mu_1 - \mu_2$: selisih kelompok perlakuan dan kontrol = $1,91 - 0,35 = 1,56$ (Mahmoudzadeh et al., 2020)

$Z_{1-\alpha/2}$ untuk $\alpha = 0,05$ adalah 1,96 (tingkat kesalahan $\alpha = 0,05$);

Berdasarkan tabel distribusi Z.

$Z_{1-\beta}$ untuk $\beta = 10\%$ adalah 1,28 (tingkat kesalahan $\beta = 0,10$);

Berdasarkan tabel distribusi Z

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, didapatkan replikasi $n = 5$.

Untuk menghindari kekurangan subyek dari jumlah minimal akibat putus uji, maka jumlah replikasi ditambah 20% menurut klasifikasi Higgins sehingga masing-masing perlakuan ditambah 20% dari hasil rumus, dan didapatkan 6 subyek untuk tiap perlakuan dengan total keseluruhan 12 ekor kelinci putih New Zealand.

4.4 Kriteria Unit Eksperimen

4.4.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi unit eksperimen penelitian ini adalah: kelinci putih *New Zealand* berjenis kelamin jantan, usia 4-10 bulan, berat badan 3.000–3.500 gram, dengan kondisi badan sehat fisik secara umum, tampak aktif, kondisi permukaan bola mata sehat, dan hasil pemeriksaan laboratorium didapatkan kadar trombosit dalam nilai rentang 390-821 x $10^9/L$ dan kadar fibrinogen terdapat dalam nilai rentang $1,66 \pm 0,39$ g/L. (Petrova et al., 2018).

4.4.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi unit eksperimen penelitian ini adalah kelinci yang dinyatakan oleh dokter hewan memiliki penyakit infeksi di mata yang berpotensi menularkan penyakit selama penelitian.

4.4.3 Kriteria Putus Uji

Kelinci sakit, mati, terjadi komplikasi seperti perforasi kornea atau perdarahan selama dan setelah operasi.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah membran *platelet-rich fibrin* pada model kornea dengan keratitis infektif bakterialis.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah ekspresi α -smooth muscle actin dan transforming growth factor- β .

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Pengukuran	Hasil	Skala
Graft <i>platelet rich fibrin</i> (PRF)	Penjahitan PRF pada permukaan kornea	Membran PRF menutupi seluruh permukaan kornea dan terfiksasi oleh jahitan di empat kuadran. Evaluasi dengan slit lamp biomicroscopy	0 = Tidak terpasang PRF 1 = Terpasang PRF	Nominal

Ekspresi α -SMA	Skor imunoreaktif dari sel kornea (pada lapisan epitel, stroma, dan endotel) yang memberi reaksi positif terhadap antibodi α -SMA pada pemeriksaan IHC	Dinilai secara semikuantitatif dengan menggunakan rerata <i>Immuno Reactive Score</i> (IRS) pada lima lapang pandang	Skor rerata IRS dari 5 lapang pandang	Interval
Ekspresi <i>Transforming growth factor</i> beta (TGF- β)	Skor imunoreaktif dari sel kornea (pada lapisan epitel, stroma, dan endotel) yang memberi reaksi positif terhadap antibodi TGF- β pada pemeriksaan IHC	Dinilai secara semikuantitatif dengan menggunakan rerata <i>Immuno Reactive Score</i> (IRS) pada lima lapang pandang	Skor rerata IRS dari 5 lapang pandang	Interval

4.7 Instrumen Penelitian

4.7.1 Sarana Penelitian

Masing-masing kelinci ditempatkan di dalam satu kandang yang terbuat dari besi berbentuk jeruji berukuran 90 cm x 60 cm x 60 cm. Makanan yang diberikan kepada kelinci adalah pakan pelet yang diberikan pagi, siang dan sore. Minuman kelinci berupa air mineral. Semua kelinci akan mendapat makanan dan minuman dengan porsi yang sama.

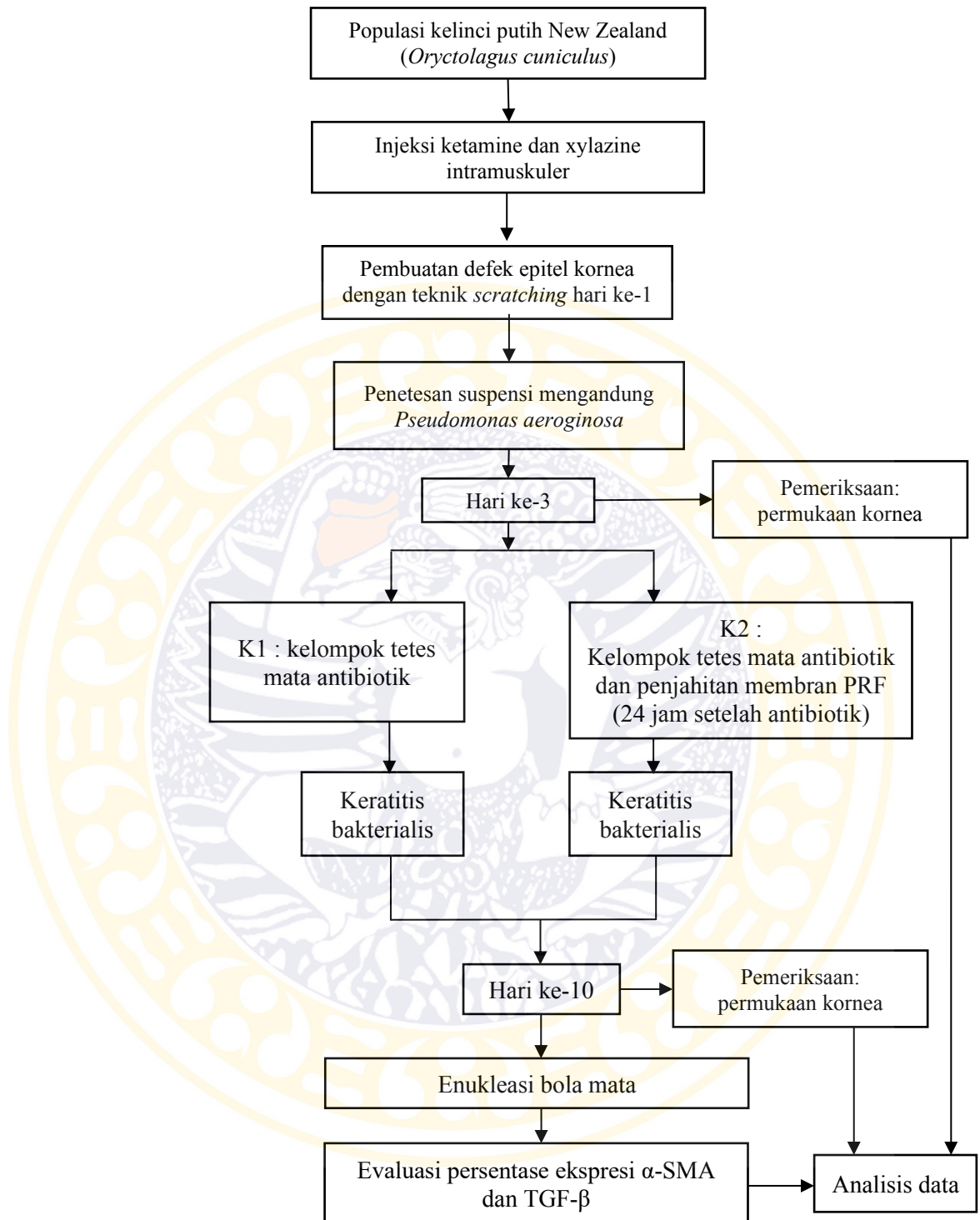
4.7.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang kelinci, lembar pengumpulan data, *handheld slit lamp*, mikroskop operasi, mikroskop operasi, spekulum kelopak mata, kaliper, spuit 21 G, set alat enukleasi mata, sarung tangan, masker penutup wajah, dan kamera digital.

Bahan yang diperlukan untuk persiapan operasi pada penelitian ini, antara lain meliputi natrium thiopental 0,1%, natrium alcaini 0,5%, tetes mata tetracaine hydrochloride 2%, povidone iodine 5%, *balanced salt solution* (BSS), lensa kontak steril, kultur *P. aeruginosa*, dan nylon 10.0.

Alat dan bahan untuk pembuatan preparat dan sediaan dengan pengecatan *Masson trichrome* meliputi: *auto stainer*, *holder staining*, *EZ Mount*, kertas saring, tisu, xylol, alkohol (70%, 80%, 96%), pewarna *Masson trichrome*, akuades steril, dam paraffin, sedangkan alat dan bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia meliputi kit antibodi anti α -SMA, kit antibodi anti TGF- β , xylol, *prophylene glycol*, buffer formalin 10%, gelatin 5%, serta alkohol (80%, 90%, 96%, dan 99%).

4.8 Protokol Penelitian



Gambar 4.2 Protokol Penelitian

4.9 Cara Kerja Penelitian

Kelinci yang memenuhi kriteria inklusi yaitu sebanyak 10 ekor. Setiap kelinci dilakukan pemeriksaan segmen anterior menggunakan *handheld slitlamp*. Induksi keratitis dilakukan di bawah kondisi aseptik menggunakan anestesi umum (menggunakan injeksi ketamine hydrochloride 30 mg/kg dan xylazine hydrochloride 5 mg/kg secara intramuskuler. Dilakukan pembuatan defek kornea menggunakan teknik *deep scratch* dengan melakukan goresan deepitelisasi pada area sentral kornea berukuran diameter 10 mm menggunakan jarum steril 21 G pada hari ke-1. Induksi keratitis bakterial dilakukan dengan penetasan sebanyak 0,3 ml dari suspensi *Pseudomonas aeruginosa* yang mengandung 5×10^8 CFU/ml. Kelinci yang telah diinduksi dipelihara dengan kondisi kandang standar yang telah ditetapkan oleh laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Populasi kelinci kemudian dilakukan random alokasi untuk pembagian kelompok menjadi K1 sebanyak 6 ekor dan K2 sebanyak 6 ekor. Dua hari setelah induksi (hari ke-3) dilakukan pemeriksaan permukaan bola mata dan pemberian tetes mata levofloxacin 0,5% sebanyak 4 kali sehari sampai hari ke-10 (Malachkova et al., 2021). Pada kelompok kontrol, lesi tidak menjalani prosedur lanjutan sedangkan pada kelompok perlakuan, lesi ditutup dengan membran PRF yang berasal dari darah kelinci itu sendiri (24 jam setelah antibiotik).

TGF- β aktif setelah terjadi luka, aktivitas TGF- β muncul dan tinggi pada 1 jam dan 5 hari setelah luka, kemudian mulai mengalami penurunan pada hari ke-7, hari ke-10, dan berakhir pada hari-14. Fase penyembuhan luka, pada fase proliferasi, fibroblas dirubah menjadi myofibroblas yang mulai terjadi pada hari ke-5, selanjutnya myofibroblas mengekspresikan α -SMA dan menuju puncaknya pada hari ke-10 (Liju Yang, Cindy X. Qiu and Mark W. J. Ferguson, 1999; Ryoichi Mori, Katsuya Tanaka, 2018), sehingga pada penelitian ini akan dilakukan enukleasi pada hari-10 untuk mengukur kadar α -SMA dan TGF- β . Pada hari ke-10 pasca operasi, setiap kelinci menjalani enukleasi mata dan pemeriksaan histopatologi, pewarnaan *Masson trichrome* dan IHC dengan antibodi α -SMA dan TGF- β .

4.9.1 Persiapan dan Produksi Membran Platelet-Rich Fibrin

Produksi *platelet-rich fibrin* pada penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur yang pertama kali dideskripsikan oleh Choukroun *et al*, di mana tidak diperlukan penambahan antikoagulan dalam proses produksinya. Spesimen darah diambil dari vena auricularis kelinci sebanyak 5 mL dan disimpan di dalam tabung gelas. Selanjutnya, spesimen darah menjalani proses sentrifugasi pada kecepatan 2700 rpm selama 12 menit hingga tampak tiga lapisan terpisah pada spesimen darah. Lapisan terbawah berwarna merah tua pada tabung adalah lapisan eritrosit, lapisan tengah merupakan lapisan yang mengandung bekuan fibrin, dan lapisan paling atas berwarna kuning merupakan lapisan

platelet-poor plasma (PPP), selanjutnya lapisan PPP diambil terlebih dahulu menggunakan pipet, kemudian bekuan fibrin dipisahkan dengan lapisan eritrosit menggunakan gunting dan selanjutnya dilakukan pengambilan lapisan fibrin menggunakan *forceps* dan dikompres menggunakan kotak PRF (*PRF box*) yaitu alat berbentuk membran yang dibuat khusus untuk mengalirkan sisa cairan dari PRF. Membran PRF selanjutnya dilakukan pemotongan untuk menyesuaikan dengan kebutuhan aplikasi pada kornea. kemudian diposisikan secara *overlay* menutupi seluruh permukaan kornea.

4.9.2 Penjahitan Membran PRF

Penjahitan dilakukan 24 jam setelah pemberian tetes mata levofloxacin 0,5% dengan dosis 4 kali satu tetes sehari. Membran PRF dijahit menggunakan benang *nylon* 10.0 secara sirkuler pada empat kuadran di superior, inferior, medial dan lateral pada area 0,5-1 mm dari limbus secara *partial thickness*. Setelah operasi, obat tetes mata levofloxacin dilanjutkan dengan dosis yang sama hingga hari ke-10

4.9.3 Pemeriksaan Imunohistokimia α -SMA dan TGF- β

Pada hari ke-10, dilakukan prosedur dilakukan pengangkatan bola mata atau enukleasi, kemudian jaringan kornea dilakukan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan α -SMA *antibody kit* dan TGF- β *antibody kit* Mata kelinci yang dienukleasi di masing-masing kelompok difiksasi dalam 10% formalin buffer untuk mencegah autolisis jaringan dan pembusukan selama 24 jam pada suhu kamar dan ditanam

dalam parafin. Proses selanjutnya yaitu jaringan kornea yang telah diisolasi kemudian difiksasi di dalam larutan *neutral buffered formalin* (NBF) 10% selama 48 jam pada suhu kamar. Jaringan yang difiksasi berukuran 20 mm x 30 mm dengan ketebalan 2-4 mm, dimana setiap 100 mg jaringan diberikan 2 ml formalin agar proses fiksasi efektif. Setelah proses paraffin block dilakukan selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi α -SMA dan TGF- β melalui pemeriksaan histopatologi. Penghitungan jumlah ekspresi protein merupakan jumlah total yang ditemukan pada lima lapangan pandang (LP) berbeda. Seluruh data pada pemeriksaan ini didapatkan pada pembesaran 400x, menggunakan mikroskop cahaya. Pemeriksaan histopatologi untuk mengetahui ekspresi α -SMA dan TGF- β pada area penyembuhan kornea. Data skor ekspresi α -SMA dan TGF- β diperoleh menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel atau area yang immunoreaktif positif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (tabel 4.2). Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) lapang pandang (LP) pada pembesaran 400x (Kaemmerer et al., 2012). Prosedur pemeriksaan pada 5 lapang pandang dan perhitungan sampel dilakukan oleh 2 orang pemeriksa yang dikerjakan secara terpisah. Untuk menghindari bias pemeriksaan, slide yang sudah berkode ditutup nomor kodenya dan diberi nomor baru secara acak, sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa

merupakan sampel kelompok apa (*blind*), kemudian hasil setiap perhitungan dicatat dan diambil nilai rata-rata atau mean per lapang pandang (Pižem and Cör, 2003).

Tabel 4.2 Skala semikuantitatif IRS untuk penilaian ekspresi α -SMA dan TGF- β . Merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

(A)		(B)		
Persentase Sel Positif	Skor	Intensitas Reaksi Warna	Skor	= IRS (0 - 12)
Tidak ada	0	Tidak ada reaksi warna	0	0 – 1 = negatif
< 10%	1	Intensitas warna rendah	1	2 – 3 = positif lemah
11-50%	2	Intensitas warna sedang	2	4 – 8 = positif sedang
51-80%	3	Intensitas warna kuat	3	9 – 12 = positif kuat
> 80%	4			

Tingkat kerusakan permukaan bola mata selanjutnya dievaluasi berdasarkan kriteria internasional yang meliputi tingkat kekeruhan kornea, neovaskularisasi kornea, defek epitel kornea, dan hiperemia permukaan bola mata. Bola mata diamati menggunakan slitlamp *portable* dan dilakukan pengambilan gambar menggunakan kamera digital. Skor tingkat kekeruhan kornea dan hiperemia permukaan bola mata akan ditentukan menjadi nilai ringan, sedang, dan berat. Defek epitel kornea dievaluasi dengan menggunakan pewarnaan fluoresein strip yang ditempelkan pada fornix inferior dan dibilas dengan aquades steril. Pewarnaan fluoresein pada permukaan kornea menunjukkan defek epitel kornea yang diamati menggunakan *cobalt blue filter* pada slitlamp *portable*.

4.10 Manajemen dan Analisis Data

4.10.1 Analisis Deskriptif

Hasil penelitian dihimpun dalam lembar pencatatan data, kemudian dikelompokkan dan disajikan dalam bentuk tabulasi serta diagram, kemudian dilakukan analisis secara deskriptif.

4.10.2 Analisis Inferensial

Data yang telah terkumpul akan dianalisis dengan menggunakan software SPSS. Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan uji normalitas metode Shapiro-Wilk dengan sampel kurang dari 50. Data ekspresi TGF- β dan α -SMA dianalisis dan diuji menggunakan *independent t-test* bila syarat terpenuhi atau *Mann-Whitney test* jika syarat tidak terpenuhi, bergantung pada normalitas distribusi data. Data dianalisis dengan tingkat signifikansi pada penelitian ini yaitu $\alpha = 0,05$.

4.11 Etika Penelitian

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

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini adalah suatu penelitian eksperimental dengan desain penelitian menggunakan *randomized posttest only control group design* dengan menggunakan hewan coba kelinci putih *New Zealand (Oryctolagus cuniculus)* yang diinduksi dengan goresan epitel kornea lalu penetasan suspensi yang mengandung *P. aeruginosa* menjadi hewan model keratitis bakterial. Hasil penelitian ini diperoleh melalui pemeriksaan imunohistokimia untuk mengevaluasi ekspresi α -SMA dan TGF- β . Data yang terkumpul selanjutnya dilakukan analisis statistik untuk melihat ekspresi α -SMA dan ekspresi TGF- β pada kedua kelompok penelitian sehingga dapat mengetahui efek membran PRF dalam penyembuhan luka kornea karena keratitis *Pseudomonas aeruginosa*,

5.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei - Juni 2022 di laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Sampel penelitian ini adalah bola mata kelinci putih *New Zealand (Oryctolagus cuniculus)* dari kelinci dewasa usia 4-10 bulan, jenis kelamin jantan dengan berat 2.000–3.000 gram sebanyak 6 ekor pada setiap kelompok, sehingga total kelinci 12 ekor.

Pemeriksaan segmen anterior okuli sebelum dilakukan penelitian menggunakan *handheld slit lamp* dan didapatkan hasil kondisi klinis dalam

batas normal, tidak didapatkan defek kornea atau neovaskularisasi kornea, tes fluorescein negatif, serta detail dari iris dan pupil tampak jelas. Selama masa observasi, masing-masing kelinci mendapat perlakuan yang sama. Makanan yang diberikan berupa pelet khusus kelinci dan minuman berupa air mineral yang sudah disesuaikan dengan porsi yang sama, dan masing-masing kelinci ditempatkan di dalam satu kandang yang terbuat dari besi berbentuk jeruji berukuran 90 cm x 60 cm x 60 cm di laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

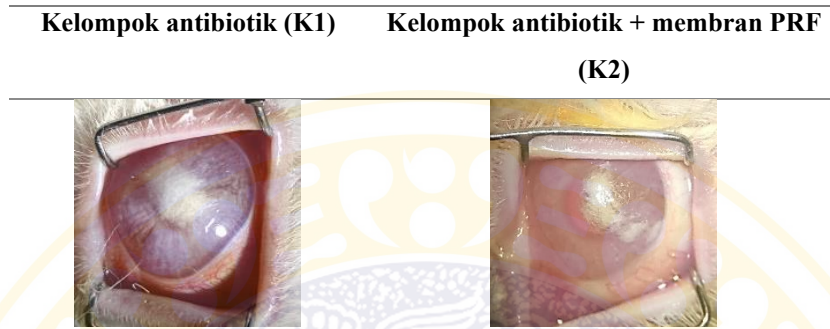
Kelinci coba dibagi menjadi dua kelompok, kelompok pertama yang dianggap sebagai kontrol (K1) diberikan terapi antibiotik topikal levofloxacin 0,5% saja selama 7 hari setelah dilakukan induksi keratitis. Sedangkan kelompok kedua yang dianggap sebagai perlakuan (K2), selain diberi antibiotik topikal yang sama juga dilakukan penjahitan membran *Platelet-Rich Fibrin* (PRF) pada kornea.

Tabel 5.1 Distribusi kadar trombosit dan fibrinogen kelinci

Parameter	n	Mean	SD	Minimum	Maksimum	Nilai Rujukkan
Trombosit (10 ³ /uL)	12	496,42	74,41	405,00	619,00	390-821
Fibrinogen (mg/dL)	12	176,23	24,33	134,20	202,30	127-205

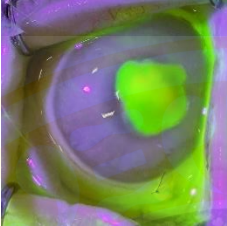
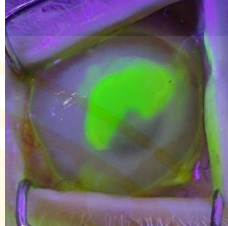
Sebelum dilakukan perlakuan, seluruh sampel kelinci diambil darahnya sebanyak 2 cc untuk pemeriksaan jumlah trombosit dan fibrinogen di laboratorium patologi klinik. Data jumlah trombosit ($p=0,205$) dan fibrinogen ($p=0,094$) berdistribusi normal. Hasil laboratorium pada tabel 5.1 didapatkan rata-rata jumlah trombosit kelinci adalah $496,42 \times 10^3/\text{uL}$

dengan standar deviasi $74,41 \times 10^3/\text{uL}$, nilai maksimum $619 \times 10^3/\text{uL}$ dan minimum $405 \times 10^3/\text{uL}$. Sedangkan rata-rata fibrinogen kelinci adalah $176,23 \text{ mg/dL}$, dengan standar deviasi $24,33 \text{ mg/dL}$, nilai maksimum $202,3 \text{ mg/dL}$ dan minimum $134,2 \text{ mg/dL}$.



Gambar 5.1 Gambaran klinis keratitis hewan coba. Setelah dilakukan observasi selama 2x24 jam pasca induksi

Pada induksi hewan coba model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*, masing-masing kelinci putih New Zealand mendapat perlakuan yang sama. Pertama dilakukan dianestesi dengan injeksi ketamine hydrochloride 30 mg/kg dan xylazine hydrochloride 5 mg/kg secara intramuskuler, kemudian dilakukan pembuatan defek kornea menggunakan teknik *deep scratch* dengan melakukan goresan deepitelisasi pada area sentral kornea berukuran diameter 10 mm menggunakan jarum steril 21 G . Induksi keratitis bakterial dilakukan dengan penetasan sebanyak $0,3 \text{ ml}$ dari suspensi *Pseudomonas aeruginosa* yang mengandung $5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$. Pada hari ke-10 dilakukan pemeriksaan menggunakan *handheld slit lamp* sebelum dilakukan terminasi hewan coba dan enukleasi untuk pemeriksaan ekspresi $\alpha\text{-SMA}$ dan $\text{TGF-}\beta$ dengan imunohistokimia. Pada pemeriksaan ditemukan adanya defek kornea yang terwarnai pada tes *fluorescein* (gambar 5.2).

	Kelompok antibiotik (K1)	Kelompok antibiotik + membran PRF (K2)
Foto klinis		
Tes fluorescein		

Gambar 5.2 Pemeriksaan defek kornea pada hari ke-10

5.2 Ekspresi α -SMA

Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) adalah isoform aktin yang mendominasi sel-sel otot polos pembuluh darah dan memiliki peranan penting pada proses fibrogenesis. Myofibroblas merupakan jenis fibroblas dengan metabolisme dan morfologi yang khas dan memiliki kemampuan untuk mengekspresikan α -SMA, dan aktivasi myofibroblas memainkan peranan penting pada respons fibrosis.

Hasil pemeriksaan ekspresi α -SMA secara imunohistokimia ditampilkan pada tabel 5.2 dan gambar 5.3. Pada lapisan kornea ekspresi α -SMA di kelompok K1 menunjukkan berdistribusi normal, dan K2 berdistribusi tidak normal. Rerata ekspresi α -SMA pada kelompok yang diberi antibiotik (K1) adalah $3,24 \pm 0,26$ (mean $\pm$ simpangan deviasi) dengan nilai minimal 0,80 dan maksimal 6,80 ($p=0,509$), sedangkan di

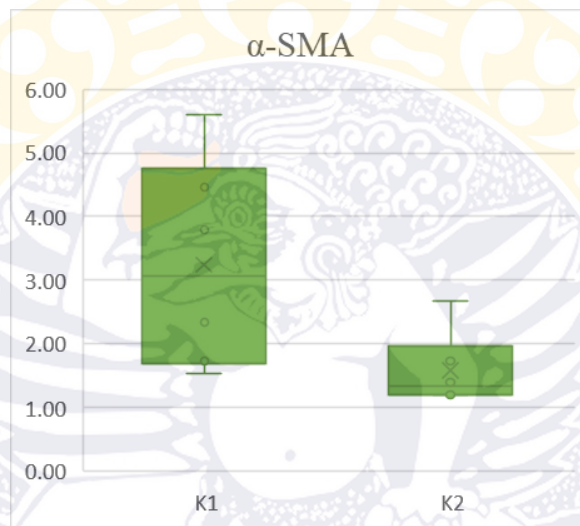
kelompok K2 yaitu median 1,30 IQD 0,33 dengan nilai minimum 0,20 dan maksimum 2,80 ($p=0,02$).

Tabel 5.2 Rerata ekspresi α -SMA

Kelompok	n	Rerata ekspresi α -SMA						p
		Mean	SD	Med	IQD	Min	Maks	
Antibiotik (K1)	6	3,24	0,26	3,20	0,30	0,80	6,80	0,03 ^{*a}
Antibiotik + membran PRF (K2)	6	1,58	0,23	1,30	0,33	0,20	2,80	

* $p < 0,05$ = signifikan

a. *Mann-Whitney test*

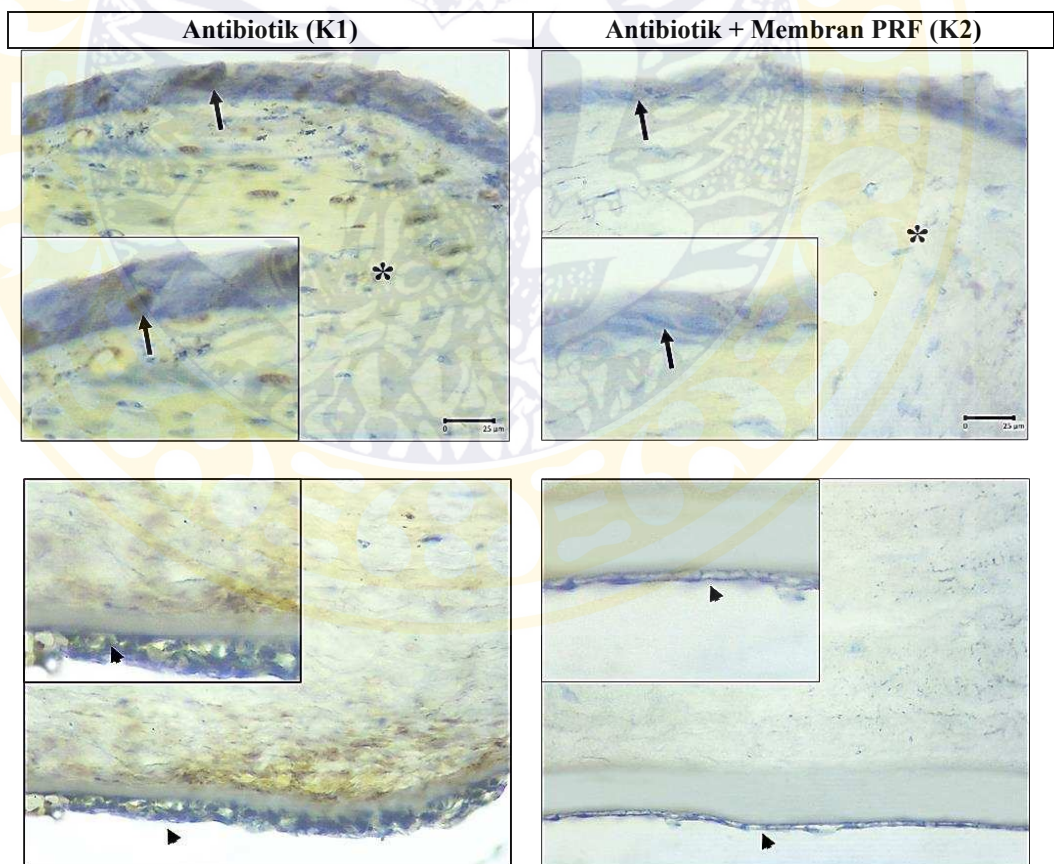


Gambar 5.3 Perbedaan rerata ekspresi α -SMA antara kelompok antibiotik (K1) dan antibiotik + membran PRF (K2)

Berdasarkan uji statistik apabila data berdistribusi normal menggunakan *independent t test* atau jika data tidak berdistribusi normal menggunakan *Mann-Whitney test*, hasil ekspresi α -SMA pada tabel 5.2 menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ekspresi α -SMA pada kornea antara kelompok antibiotik dengan kelompok antibiotik + membran PRF dengan hasil $p=0,03$. Hasil rerata ekspresi α -SMA di kornea pada kelompok K1 adalah 3,24 dan pada kelompok K2 adalah 1,58, sehingga menunjukkan

rerata ekspresi α -SMA pada kelompok antibiotik + membran PRF lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja.

Gambaran ekspresi α -SMA secara histopatologi dapat ditandai dengan warna coklat kromogen yang tampak seperti pada gambar 5.4. Perbandingan ekspresi α -SMA pada epitel kornea, stroma dan endotel diantara kelompok perlakuan. Ekspresi α -SMA pada sel-sel keratosit nampak dominan terjadi pada sel keratosit penyusun lapisan epitelial dibandingkan dengan ekspresi α -SMA pada stroma dan sel endotel. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi α -SMA pada sel epitelial kelompok kontrol (antibiotik) lebih kuat dibandingkan dengan kelompok perlakuan (antibiotik + membran PRF).



Gambar 5.4 Perbandingan ekspresi α -SMA pada epitel kornea (panah) dan sel endotel (kepala panah) serta stroma (tanda *) diantara kelompok perlakuan. Pewarnaan immuno histokimia, *objective lens* 40x; bar = 50 mikron; mikroskop *Eclipse E-i*; camera DS Fi2 300 megapixel)

5.3 Ekspresi TGF- β

TGF- β merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang paling aktif terlibat pada proses penyembuhan luka kornea. Cedera kornea melibatkan ruptur lapisan kornea dan membran Bowman, yang selanjutnya mengakibatkan stroma anterior terpapar terhadap sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya, salah satunya TGF- β . Di bawah pengaruh TGF- β 1 aktif, sel-sel keratosit mengalami diferensiasi menjadi myofibroblas, Sel-sel myofibroblas kemudian menutupi luka dan mulai mensintesis matriks ekstraseluler baru.

Hasil pemeriksaan ekspresi TGF- β secara imunohistokimia ditampilkan pada tabel 5.3, tabel 5.4 dan gambar 5.5, dimana menunjukkan ekspresi TGF- β pada kornea dan pada tiap lapisan kornea: epitel, stroma dan endotel. Data ekspresi TGF- β didapatkan pada lapisan kornea di kelompok K1 menunjukkan berdistribusi normal, dan K2 berdistribusi tidak normal. Rerata ekspresi α -SMA pada kelompok yang diberi antibiotik (K1) adalah $1,33 \pm 0,56$ (mean $\pm$ simpangan deviasi) dengan nilai minimal 0,00 dan maksimal 1,33 ($p=0,662$), sedangkan di kelompok K2 yaitu median 0,20 IQD 0,48 dengan nilai minimum 0,00 dan maksimum 2,40 ($p=0,06$).

Data ekspresi TGF- β pada masing-masing lapisan kornea, didapatkan hasil di lapisan epitel adalah data berdistribusi normal pada kelompok K1 dan data berdistribusi tidak normal pada kelompok K2. Rerata ekspresi TGF- β pada di kelompok K1 berdistribusi normal yaitu mean $2,60 \pm 1,49$ (mean $\pm$ simpangan deviasi) dengan nilai minimum 0,80 dan

maksimum 4,80 ($p=0,504$), sedangkan di kelompok K2 berdistribusi tidak normal yaitu median 0,20 IQD 0,15 dengan nilai minimum 0,20 dan maksimum 0,60 ($p=0,000$). Data ekspresi TGF- β pada lapisan stroma didapatkan data berdistribusi tidak normal pada kelompok K1 dan K2, namun setelah dilakukan uji logaritma natural didapatkan hasil data pada kelompok K1 dan K2 menjadi distribusi normal dengan rerata ekspresi TGF- β di kelompok K1 yaitu mean $1,03 \pm 0,99$ (mean $\pm$ simpangan deviasi) dengan nilai minimum 0,20 dan maksimum 3,20 ($p=0,388$), sedangkan di kelompok K2 yaitu mean $0,83 \pm 0,98$ (mean $\pm$ simpangan deviasi) dengan nilai minimum 0,00 dan maksimum 2,40 ($p=0,435$). Data ekspresi TGF- β pada lapisan endotel didapatkan data berdistribusi normal pada kelompok K1 dan data berdistribusi tidak normal pada kelompok K2, pada lapisan endotel didapatkan data dengan rerata ekspresi TGF- β pada dengan rerata ekspresi TGF- β di kelompok K1 berdistribusi normal yaitu mean $0,37 \pm 0,33$ (mean $\pm$ simpangan deviasi) dengan nilai minimum 0,00 dan maksimum 1,00 ($p=0,149$), sedangkan di kelompok K2 berdistribusi tidak normal yaitu median 0,10 IQD 1,25 dengan nilai minimum 0,00 dan maksimum 1,80 ($p=0,009$).

Tabel 5.3 Rerata ekspresi TGF- β pada kornea

Kelompok	n	Rerata ekspresi α -SMA						
		Mean	SD	Med	IQD	Min	Maks	p
Antibiotik (K1)	6	1,33	0,56	0,80	0,45	0,00	1,33	0,054 ^a
Antibiotik + membran PRF (K2)	6	0,57	0,32	0,20	0,48	0,00	2,40	

a. *Mann-Whitney test*

Berdasarkan uji statistik apabila data berdistribusi normal menggunakan *independent t test* atau jika data tidak berdistribusi normal menggunakan *Mann-Whitney test*, Hasil ekspresi TGF- β pada tabel 5.3 menunjukkan terdapat perbedaan tidak signifikan pada ekspresi TGF- β di kornea antara kelompok antibiotik (K1) dengan kelompok antibiotik + membran PRF (K2) dengan hasil $p=0,054$.

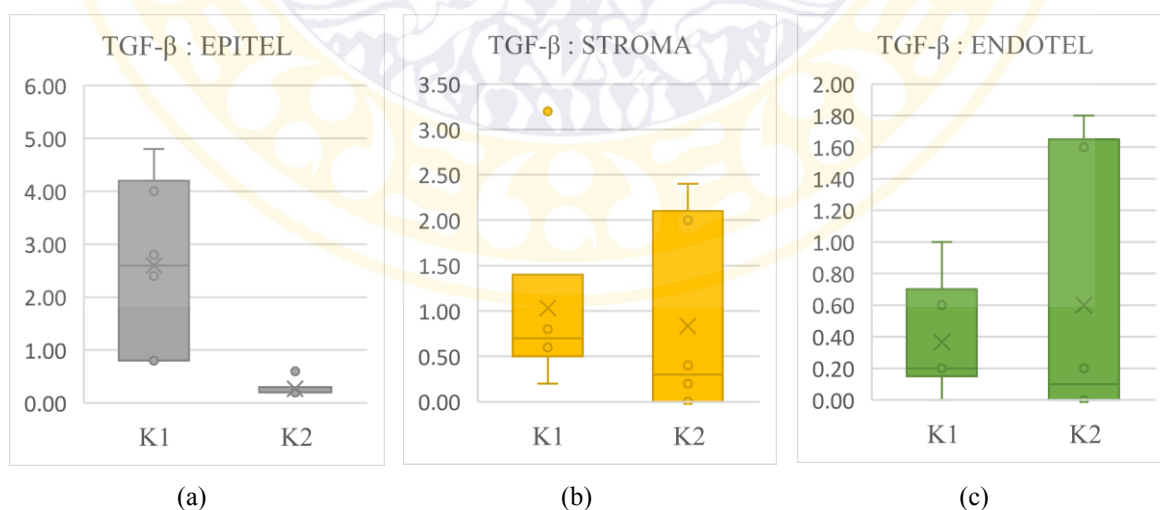
Tabel 5.4 Rerata ekspresi TGF- β pada lapisan epitel, stroma dan endotel

Kelompok	n	Rerata ekspresi TGF-β						
		Mean	SD	Med	IQD	Min	Maks	p
Epitel								
Antibiotik (K1)	6	2,60	1,49	2,60	2,50	0,80	4,80	0,003* ^b
Antibiotik + membran PRF (K2)	6	0,27	0,15	0,20	0,00	0,20	0,60	
Stroma								
Antibiotik (K1)	6	1,03	0,99	0,70	0,20	0,20	3,20	0,440 ^a
Antibiotik + membran PRF (K2)	6	0,83	0,98	0,30	1,55	0,00	2,40	
Endotel								
Antibiotik (K1)	6	0,37	0,33	0,20	0,30	0,00	1,00	0,740 ^b
Antibiotik + membran PRF (K2)	6	0,60	0,78	0,10	1,25	0,00	1,80	

* $p < 0,05$ = signifikan

a. *Independent t test*

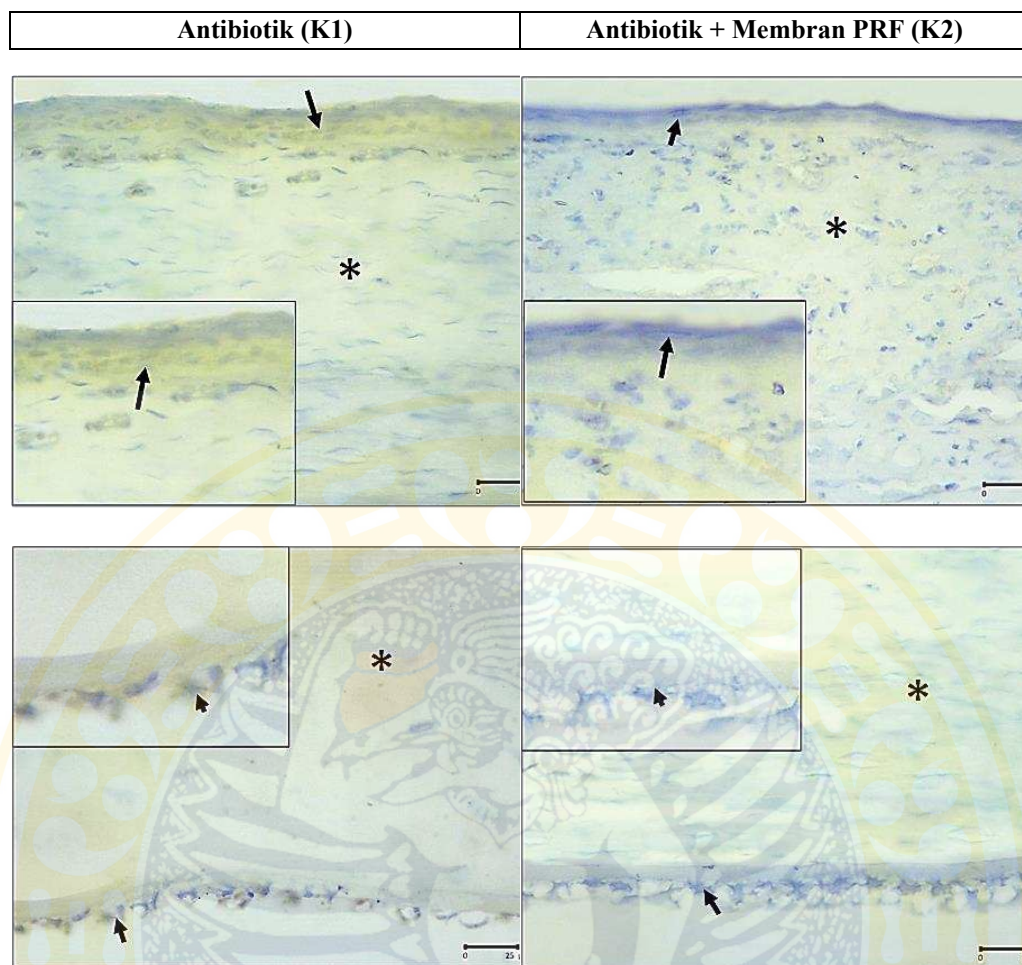
b. *Mann-Whitney test*



Gambar 5.5 Perbedaan rerata ekspresi TGF- β antara kelompok antibiotik (K1) dan antibiotik + membran PRF (K2). (a) Pada lapisan epitel, (b) pada lapisan stroma, (c) pada lapisan endotel.

Berdasarkan uji statistik apabila data berdistribusi normal menggunakan *independent t test* atau jika data tidak berdistribusi normal menggunakan *Mann-Whitney test*, Hasil ekspresi TGF- β pada tabel 5.4 menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi TGF- β di lapisan epitel kornea antara kelompok antibiotik (K1) dengan kelompok antibiotik + membran PRF (K2) dengan hasil $p=0,003$. Sedangkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok pada lapisan stroma ($p=0,440$) dan lapisan endotel ($p=0,740$). Hasil rerata ekspresi TGF- β di lapisan epitel kornea pada kelompok K1 adalah 2,60 dan pada kelompok K2 adalah 0,27, sehingga menunjukkan rerata ekspresi TGF- β pada kelompok antibiotik + membran PRF lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja.

Gambaran ekspresi TGF- β secara histopatologi dapat ditandai dengan warna coklat kromogen yang tampak seperti pada gambar 5.6. Ekspresi TGF- β pada sel-sel keratosit nampak dominan terjadi pada sel keratosit penyusun lapisan epitelial dibandingkan dengan ekspresi TGF- β pada stroma dan sel endotel. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi TGF- β pada sel epitelial kelompok kontrol (antibiotik) lebih kuat dibandingkan dengan kelompok perlakuan (kelompok antibiotik + membran PRF).



Gambar 5.6 Perbandingan ekspresi TGF- β pada epitel kornea (panah) dan sel endotel (kepala panah) serta stroma (*) diantara kelompok perlakuan. Pewarnaan immuno histokimia, *objective lens* 40x; bar = 50 mikron; mikroskop *Eclipse E-i*; camera DS Fi2 300 megapixel)

BAB 6

PEMBAHASAN

Keratitis Infeksi (mikrobal keratitis) adalah penyebab tersering dari keratitis adalah penglihatan proses mengancam yang ditandai dengan defek epitel kornea dengan adanya peradangan pada stroma kornea. Bakteri, virus, jamur dan organisme parasit semuanya mungkin terjadi penyebab kondisi darurat medis ini. Kondisi klinis yang ditimbulkan bervariasi dan tergantung pada jenis agen penyebab. Keratitis infeksi sebagai keadaan darurat medis yang serius dan mungkin mengancam mata membutuhkan pengobatan yang cepat dan tepat (Srinivasan, 2012). Keratitis yang diakibatkan oleh *Pseudomonas* umumnya memiliki presentasi yang lebih berat dibandingkan keratitis akibat spesies bakteri lainnya dan seringkali menjadi tantangan dalam penatalaksanaannya, yang berujung pada risiko prognosis penglihatan yang lebih buruk dibandingkan keratitis bakteri lainnya (Lakhundi et al., 2017). Prinsip dalam penatalaksanaan keratitis infeksius adalah pertama dengan mengendalikan infeksi dan inflamasi dan kedua dengan membantu proses penyembuhan epitel kornea. Tindakan pembedahan dapat dipertimbangkan apabila terapi medikamentosa tidak efektif menurunkan progresifitas keratitis infeksius (Salmon, 2020).

Pembentukan fibrosis disebabkan karena deposisi berlebih dan abnormal komponen matriks ekstraseluler. TGF- β adalah kunci utama proses fibrosis dalam penyembuhan luka, berperan dalam stimulasi migrasi fibroblas yang berfungsi mensintesis matriks ekstraseluler. Matriks ekstraseluler tersusun dari kolagen (komponen terbanyak), myofibroblas yang berperan dalam penutupan luka dan protein lainnya. Myofibroblas mengandung aparatus *smooth muscle cell*, α -*smooth muscle actin* (α -SMA) dan dapat diidentifikasi melalui pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi α -SMA. Myofibroblas telah terdeteksi pada kontraktur luka di kulit, kornea dan konjungtiva. Aktivasi jangka panjang fibroblas pada organ yang terkena mengakibatkan deposisi matriks ekstraseluler berlebih dan kolagen dan myofibroblas yang berlebih pula. Memodulasi aktivitas fibroblas, terutama pada fase proliferasi, menjadi mekanisme penting untuk mengontrol hasil akhir penyembuhan luka (Verrechia & Mauviel, 2007; Can *et al.*, 2016; Zada *et al.*, 2017).

Membran PRF banyak mengandung matriks protein serta faktor pertumbuhan yang penting dalam membantu proses penyembuhan luka seperti *platelet-derived growth factors* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *transforming growth factor* (TGF- β) yang dilepaskan bertahap selama 7 hingga 28 hari (Dohan *et al.*, 2006; Ghanaati *et al.*, 2014; Miron *et al.*, 2017). Pencangkokan membran PRF pada descemetocle adalah teknik bedah baru, tampak aman dan efektif, yang menjaga integritas anatomi mata. Di sampingnya arsitektur fibrin 3-D autologus, pelepasan berkepanjangan faktor

pertumbuhan yang penting untuk regenerasi jaringan, penggabungan dengan kornea sehat di sekitarnya, dan induksi sintesis lamela kolagen baru adalah keuntungan utama dari membran PRF. Selain itu juga dapat mengoptimalkan penyembuhan luka, membran PRF dapat mencegah pembentukan fibrosis dengan cara memodifikasi ekspresi TGF- β dan menekan ekspresi berlebihnya. Hal tersebut sesuai dengan studi yang dilakukan oleh Intriago di tahun 2017 yang meneliti pengaruh membran PRF pada sel gingiva manusia secara *in vitro*. Pada penelitian tersebut disimpulkan bahwa membran PRF mendorong fase awal penyembuhan luka. Namun, juga mencegah pembentukan fibrosis melalui supresi diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas (Mehmet *et al*, 2016; Can *et al.*, 2016; Intriago, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek membran PRF dalam penyembuhan luka kornea karena keratitis *Pseudomonas aeruginosa*, terutama pada myofibroblas yang terekspresi oleh antibodi α -SMA intraseluler dan aktivitas TGF- β secara imunohistokimia.

6.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel kelinci putih New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dengan jumlah sebanyak 12 ekor yang dibagi menjadi dua kelompok dan masing-masing 6 mata, dengan usia 4-10 bulan dan berat badan 2.000-3.000 gram. Semua kelinci dilakukan induksi keratitis dengan inokulasi *Pseudomonas aeruginosa* kemudian dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama adalah kelinci yang diberi terapi antibiotik saja, dan kelompok

kedua adalah kelinci yang diberi terapi antibiotik dan membran *Platelet Rich Fibrin* (PRF). Hewan coba kelinci putih New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dipilih karena anatomi mata kelinci mirip dengan anatomi mata manusia sehingga mempermudah prosedur saat dilakukan tindakan penjahitan graft PRF pada kornea (Malachkova et al., 2021).

Semua sampel hewan coba dilakukan diberikan waktu selama 7 hari di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk adaptasi terhadap lingkungan baru, Masing-masing hewan coba menempati satu kandang yang terpisah dan dilakukan pelabelan di dalam ruangan dengan pendingin ruangan dan *exhaust fan* untuk menjaga sirkulasi udara cukup baik, Semua sampel mendapat perlakuan yang sama, makanan diberikan berupa palet dan minuman berupa air mineral yang telah diberikan dengan porsi yang sama. Tujuan hal ini adalah agar hewan coba yang rentan terhadap stress, bisa bertahan selama periode penelitian dan selalu terjaga kesehatannya. Sampel penelitian selama periode waktu penelitian semua dalam keadaan sehat hingga hari ke-10.

Semua sampel hewan coba diambil darahnya untuk pemeriksaan laboratorium yaitu trombosit atau platelet dan fibrinogen. Kelinci dengan kadar trombosit dan fibrinogen dalam batas normal sesuai dengan kriteria inklusi dikatakan memenuhi syarat untuk dimasukkan ke dalam penelitian. Menurut Marx (2001), perhitungan jumlah trombosit atau platelet telah diterima sebagai indeks utama untuk memastikan kualitas konsentrasi platelet (Marx, 2001). Pada penelitian ini, kami memeriksa jumlah trombosit kelinci sebelum dilakukan

tindakan operasi. Perhitungan jumlah trombosit berasal dari sampel *whole-blood* dari vena auricularis sebanyak 2 cc Hasil laboratorium didapatkan rata-rata jumlah trombosit kelinci adalah $496,42 \times 10^3/\mu\text{L}$ dengan standar deviasi $74,41 \times 10^3/\mu\text{L}$, nilai maksimum $619 \times 10^3/\mu\text{L}$ dan minimum $405 \times 10^3/\mu\text{L}$. Sedangkan rata-rata fibrinogen kelinci adalah $176,23 \text{ mg/dL}$, dengan standar deviasi $24,33 \text{ mg/dL}$, nilai maksimum $202,3 \text{ mg/dL}$ dan minimum $134,2 \text{ mg/dL}$. Menurut Hacourt (2002), jumlah trombosit kelinci normal yaitu berkisar antara 250.000-600.000 $\text{rb}/\mu\text{L}$. Kekurangan dari metode pemeriksaan jumlah platelet dari sampel darah *whole-blood* yaitu sampel darah mengandung anti-koagulan, sedangkan sampel darah pada PRF tidak mengandung antikoagulan. Selain itu, meskipun platelet segera diperiksa dan dihitung segera setelah pengambilan, metode tersebut tidak dapat memperhitungkan kemungkinan hilangnya platelet selama proses persiapan. Sebagai contoh, platelet dapat dengan mudah menempel pada permukaan dalam tabung gelas, pada alat kompresi (PRF *box*) atau dapat rusak selama proses kompresi. Sedangkan berdasarkan studi lain yang dilakukan oleh Ehrenfest *et al* mengenai komposisi PRF, platelet didapatkan terdistribusi merata pada *clot* PRF dan jarang ditemukan tertinggal, baik pada lapisan sel darah merah, plasma aseluler serta eksudat yang dihasilkan setelah kompresi *clot* PRF. (Ehrenfest *et al.*, 2010; Intriago MFB, 2017; Kitamura *et al.*, 2018; Kobayashi, 2015; Watanabe *et al.*, 2017).

Membran PRF dibuat dengan mengambil sampel darah dari vena auricularis kelinci sebanyak 5 ml kemudian disimpan dalam tabung gelas tanpa

antikoagulan. Kemudian, sampel darah tersesbut segera disentrifugasi dengan kecepatan 2700 rpm selama 12 menit menggunakan *table centrifuge system*. Prosedur pembuatan PRF mengacu pada standar protokol sesuai Choukroun (Dohan Ehrenfest et al., 2010). Setelah selesai proses sentrifugasi, terdapat tiga lapisan yang terbentuk antara lain sel darah merah pada bagian bawah, *clot* PRF di bagian tengah dan plasma aselular sebagai supernatan di bagian atas. *Clot* PRF diambil dari tabung kemudian bagian sel darah merah di bagian bawah dibuang dengan cara digunting. PRF dijadikan membran dengan cara dikompresi dengan alat PRF *box*. Penelitian yang dilaporkan oleh Ehrenfest (2014) bahwa membran PRF yang dihasilkan dari sentrifugasi dengan kecepatan 2700 rpm selama 12 menit menghasilkan ukuran yang lebih besar dan lebih stabil serta tetap dalam kondisi yang baik hingga 7 hari paska pembuatannya. Penurunan kecepatan sentrifugasi dan peningkatan waktu sentrifugasi menghasilkan konsentrasi trombosit yang lebih tinggi di bagian distal bekuan darah, meskipun pengamatan ini tidak terbukti secara pasti (Ehrenfest et al., 2014; Miron et al., 2019).

Membran PRF terdiri dari matriks fibrin yang terpolimerasi secara alami melalui proses sentrifugasi, gabungan platelet, lekosit, sitokin dan juga *circulating stem cells*. Membran PRF terdiri dari 95% platelet dan 50% lekosit ketika pertama kali diambil. Platelet terkonsentrasi pada lapisan tengah antara lapisan sel darah merah dan *clot* fibrin, menggambarkan *buffy coat* makroskopik di permukaan *clot* PRF. Sehingga, ketika klinisi mengambil *clot* untuk aplikasi pembedahan, sebaiknya diambil pada lapisan putih di tengah dan tetap mempertahankan sedikit

lapisan sel darah merah di bagian terbawah *clot* PRF sehingga banyak kandungan platelet (Dohan Ehrenfest et al., 2010).

Pemberian terapi antibiotik topikal mulai diberikan dua hari setelah induksi keratitis pada kedua kelompok dengan dosis empat kali sehari sampai hari ke-10. Pada kelompok perlakuan dilakukan penjahitan membram PRF sebagai graft pada kornea di hari ke-3 atau 24 jam setelah dimulai terapi antibiotik, hal ini dilakukan dengan alasan masalah etik dimana tidak diizinkan melakukan tindakan invasif tanpa memberikan terapi empiris pada hewan coba hidup. Selanjutnya pada hari ke-10, setelah dilakukan evaluasi kondisi klinis, seluruh kelinci dikorbankan untuk dilakukan enukleasi mata yang dilanjutkan dengan pengawetan dengan dimasukkan ke dalam larutan buffer formalin 10%. Kemudian dilakukan preparasi untuk pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi α -SMA dan TGF- β . Jaringan kornea dipotong pada area defek kornea yang mengalami keratitis dan dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

6.2 Pengaruh PRF terhadap ekspresi α -SMA

Myofibroblas merupakan salah satu jenis sel fibroblas yang mengalami diferensiasi secara parsial menuju fenotip otot polos. Myofibroblas dapat berkontraksi dengan menggunakan beberapa jenis protein sitoskeleton yang umumnya ditemukan di dalam sel-sel otot polos, salah satunya α -SMA. Sel-sel

ini memiliki kemampuan dalam mempercepat perbaikan jaringan dengan menyebabkan kontraksi tepi-tepi luka. Kontraksi luka oleh myofibroblas terjadi antara hari ke-7 dan ke-14 setelah luka. Pada akhir proses penyembuhan luka, myofibroblas dieliminasi dari area luka melalui apoptosis dan digantikan oleh fibroblas, setelah proses penyembuhan luka selesai, sel-sel myofibroblas akan mengalami apoptosis. Gaya kontraktile yang besar yang dihasilkan oleh myofibroblas memiliki peranan penting terhadap remodeling jaringan secara fisiologis, namun memiliki dampak negatif terhadap fungsi jaringan ketika dihasilkan secara berlebihan, misalnya pada kasus fibrosis hipertrofik (Cherng et al., 2008).

Pemeriksaan ekspresi α -SMA menggunakan metode imunohistokimia dengan antibodi anti- α -SMA. Data skor ekspresi α -SMA diperoleh menurut metode Remmele dimana indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel atau area yang imunoreaktif positif dengan skor intensitas warna pada sel imunoreaktif. Pengamatan dilakukan pada lima lapang pandang lalu dihitung reratanya. Ekspresi α -SMA ditandai dengan adanya warna coklat kromogen.

Penelitian ini menganalisis pengaruh membran PRF terhadap inhibisi ekspresi α -SMA. Berdasarkan hasil uji *independent t-test* pada penelitian kami didapatkan persentase ekspresi α -SMA di lapisan epitel dan stroma antara kelompok antibiotik (K1) dengan kelompok antibiotik + membran PRF (K2)

adalah tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan hasil pada lapisan epitel ($p=0,079$) dan lapisan stroma ($p=0,080$). Pada lapisan endotel hasil uji menggunakan *Mann-Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi α -SMA dengan hasil $p=0,028$ ($\alpha < 0,05$) antara kelompok antibiotik dengan kelompok antibiotik + membran PRF. Hasil rerata ekspresi α -SMA di lapisan endotel kornea pada kelompok K1 adalah 2,90 dan pada kelompok K2 adalah 0,97, sehingga menunjukkan rerata ekspresi α -SMA pada kelompok antibiotik + membran PRF lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja, maka dapat disimpulkan dari penelitian ini bahwa membran PRF dapat menurunkan ekspresi α -SMA pada lapisan endotel kornea. Pada penelitian Can *et al* (2016) melaporkan pada fase awal penyembuhan luka, membran PRF melepaskan faktor pertumbuhan dalam jumlah besar, namun ekspresi faktor penyembuhan mulai menghilang pada hari ke-7 pasca pemasangan membran PRF, dimana mulai terjadi degradasi. Membran PRF juga dapat mencegah terjadinya fibrosis dengan cara memodulasi aktivasi fibroblas melalui modifikasi ekspresi α -SMA dan menekan ekspresi berlebihnya. α -SMA dikenal sebagai stimulator proliferasi berbagai sel mesenkim dan merupakan agen fibrosis paling kuat dibandingkan dengan sitokin lainnya. α -SMA menstimulasi kemotaksis fibroblas, meningkatkan integrinnya serta berperan penting pada sintesis molekul matriks seperti kolagen tipe 1 dan fibronektin. Sitokin ini juga diperlukan pada diferensiasi myofibroblas. Ekspresi α -SMA, terutama α -

SMA1, yang berlebih dan berkepanjangan berhubungan dengan terjadinya fibrosis fibrotik (Verrecchia dan Mauviel, 2007; Can *et al.*, 2016; Intriago, 2017; Miron *et al.*, 2017). Fibrosis terbentuk oleh karena deposisi berlebih dan abnormal komponen matriks ekstraseluler. TGF- β adalah kunci utama proses fibrosis dalam penyembuhan luka, berperan dalam stimulasi migrasi fibroblas yang berfungsi mensintesis matriks ekstraseluler. Matriks ekstraseluler tersusun dari kolagen (komponen terbanyak), myofibroblas yang berperan dalam penutupan luka dan protein lainnya. Myofibroblas mengandung aparatus *smooth muscle cell*, α -*smooth muscle actin* (α -SMA). Aktivasi jangka panjang fibroblas pada organ yang terkena mengakibatkan deposisi matriks ekstraseluler berlebih dan kolagen dan myofibroblas yang berlebih pula. Memodulasi aktivitas fibroblas, terutama pada fase proliferasi, menjadi mekanisme penting untuk mengontrol hasil akhir penyembuhan luka (Verrecchia and Mauviel, 2007; Can *et al.*, 2016; Zada *et al.*, 2017). Tujuan penelitian ini adalah menganalisis penurunan ekspresi α -SMA pada kornea kelinci model keratitis *Pseudomonas aeruginosa* pasca pemberian membran PRF, dan didapatkan hasil penurunan ekspresi α -SMA sehingga dapat membantu terbentuknya fibrosis berlebih dan mengurangi terjadinya penurunan tajam penglihatan pasca penyembuhan luka,

Penelitian ini dilakukan enukleasi pada kelompok penelitian di hari ke-10 untuk mengukur kadar α -SMA, dengan alasan fase penyembuhan luka, pada fase proliferasi, fibroblas dirubah menjadi myofibroblas yang mulai terjadi pada

hari ke-5, selanjutnya myofibroblas mengekspresikan α -SMA dan menuju puncaknya pada hari ke-10 (Liju Yang, Cindy X. Qiu and Mark W. J. Ferguson, 1999; Ryoichi Mori, Katsuya Tanaka, 2018). Pada studi yang dilaporkan Singh *et al* menyebutkan bahwa ekspresi α -SMA tidak terdeteksi pada fase awal pasca terjadinya luka kornea, ekspresi α -SMA mulai terdeteksi satu hingga dua minggu setelah peningkatan ekspresi TGF- β (Singh *et al.*, 2014). Studi oleh Pergolizzi *et al.* melaporkan adanya ekspresi α -SMA pada model keratitis *ex vivo* karena infeksi *herpes simplex virus-1* (HSV-1) di dalam epitel kornea, α -SMA sering digunakan sebagai penanda myofibroblas dan berperan penting dalam penyembuhan luka, terutama selama fase remodeling. Pada studi yang dilaporkan Kamil dan Mohan, menyebutkan munculnya myofibroblast merupakan ciri khas penyembuhan stroma, dan myofibroblas tidak muncul pada kornea normal karena myofibroblas adalah sel fibroblastik yang memiliki fungsi struktural dan fungsional yang mirip dengan otot polos. Myofibroblas dideteksi dengan peningkatan ekspresi α -SMA. Myofibroblas juga melepaskan TGF dan dapat mendorong pembentukan dan dipertahankan di stroma bahkan setelah suplai TGF- β dari epitel berhenti (Kamil and Mohan, 2021).. Studi lain oleh Spurlin dan Lwigale juga menunjukkan peningkatan jumlah sel-sel stroma positif α -SMA pada sampel kornea yang mengalami proses inflamasi (Pergolizzi *et al.*, 2020; Spurlin III and Lwigale, 2013). Spurlin dan Lwigale melaporkan adanya peningkatan ekspresi α -SMA pada proses penyembuhan kornea

embrionik. Selain itu, ekspresi α -SMA pada luka kornea neonatus dan dewasa juga terbukti terjadi di dalam stroma kornea dan bertahan dalam waktu yang lama (minggu hingga bulan) (Spurlin III and Lwigale, 2013).

Pada penelitian ini terlihat perbedaan jumlah ekspresi α -SMA yang cukup jauh antar lapisan kornea dimana ekspresi α -SMA paling banyak berada pada lapisan endotel kornea bila dibandingkan pada lapisan epitel atau stroma. Penelitian yang dilaporkan oleh Kamil dan Mohan (2020), luka pada endotel menyebabkan apoptosis keratosit di stroma posterior, namun belum diketahui apakah endotel membentuk myofibroblas di stroma, namun sel endotel dapat memperoleh fenotipe myofibroblastik yang disebut transisi endotel ke mesenkimal yang distimulasi oleh aktivitas TGF- β . Transisi ini dapat berakibat terjadi komplikasi pada endotel yang mengancam tajam penglihatan yaitu terbentuk fibrosis endotel (Kamil and Mohan, 2021). Pada studi yang dilaporkan Wilson (2020), menyebutkan pada kornea kelinci yang mengalami keratitis *Pseudomonas aeruginosa* yang berat dan telah diobati dengan antibiotik pada dua bulan setelah infeksi, sebagian stroma anterior memiliki ekspresi α -SMA dan myofibroblas yang sangat sedikit, dan muncul neovascularisasi, dan karena infeksi yang luas, mengakibatkan kerusakan membran descemet dan endotel kornea, dan ekspresi α -SMA dan myofibroblas terdeteksi di stroma posterior (Wilson, 2020).

6.3 Pengaruh PRF terhadap ekspresi TGF- β

TGF- β merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang paling aktif terlibat pada proses penyembuhan luka kornea. Cedera kornea melibatkan ruptur lapisan kornea dan membran Bowman, yang selanjutnya mengakibatkan stroma anterior terpapar terhadap sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya, khususnya TGF- β dan PDGF yang berasal dari sel-sel epitel kornea, humor akuos, konjungtiva, dan air mata. Di bawah pengaruh TGF- β 1 aktif, sel-sel keratosit yang terdapat pada stroma anterior dan/atau sel-sel yang berasal dari sumsum tulang mengalami diferensiasi menjadi myofibroblas, kemudian berproliferasi, dan bermigrasi menuju lesi. Kadar TGF- β 1 secara efektif dipertahankan oleh adanya extra domain-A dari fibronektin di dalam matriks ekstraseluler. Sel-sel myofibroblas kemudian menutupi luka dan mulai mensintesis matriks ekstraseluler baru (Rocher et al., 2020). Proses penyembuhan lesi kornea ketika selesai terjadi, sel-sel myofibroblas selanjutnya mengalami apoptosis yang diinduksi oleh IL-1. IL-1 diproduksi oleh sel-sel stroma dan memungkinkan rekolonisasi stroma anterior oleh keratosit. Sel-sel myofibroblas kemudian akan melakukan remodeling matriks ekstraseluler pada situs luka dengan kerja dari enzim MMP, sehingga terjadi restrukturisasi arsitektur jaringan kornea yang memiliki peranan penting dalam mengembalikan transparansi dan integritas kornea (Rocher et al., 2020).

Setiap kelinci menjalani enukleasi mata dan pemeriksaan histopatologi, pewarnaan *Masson trichrome* dan IHC dengan antibodi α -SMA dan TGF- β pada

hari ke-10 pasca operasi untuk mengukur kadar α -SMA dan TGF- β . Pada beberapa penelitian sebelumnya yang dilaporkan, TGF- β aktif setelah terjadi luka, aktivitas TGF- β muncul dan tinggi pada 1 jam dan 5 hari setelah luka, kemudian mulai mengalami penurunan pada hari ke-7, hari ke-10, dan berakhir pada hari-14. Fase penyembuhan luka, pada fase proliferasi, fibroblas dirubah menjadi myofibroblas yang mulai terjadi pada hari ke-5, selanjutnya myofibroblas mengeskspresikan α -SMA dan menuju puncaknya pada hari ke-10 (Liju Yang, Cindy X. Qiu and Mark W. J. Ferguson, 1999; Ryoichi Mori, Katsuya Tanaka, 2018).

Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney* pada penelitian kami didapatkan persentase ekspresi TGF- β di lapisan epitel menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi TGF- β dengan hasil $p=0,003$ ($\alpha < 0,05$) antara kelompok antibiotik dengan kelompok antibiotik + membran PRF. Sedangkan, hasil pada lapisan stroma dan endotel antara kelompok antibiotik (K1) dengan kelompok antibiotik + membran PRF (K2) adalah tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan hasil pada lapisan epitel ($p=0,440$) dan lapisan stroma ($p=0,740$). Hasil rerata ekspresi TGF- β di lapisan epitel kornea pada kelompok K1 adalah 2,60 dan pada kelompok K2 adalah 0,27, sehingga menunjukkan rerata ekspresi TGF- β pada kelompok antibiotik + membran PRF lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja, maka dapat disimpulkan dari penelitian ini bahwa membran PRF dapat menurunkan ekspresi TGF- β pada lapisan epitel kornea. Pada studi lain disebutkan salah satu sumber TGF- β di dalam air mata adalah epitel kornea karena

epitel permukaan mata secara fisiologis memproduksi TGF- β 1 dan TGF- β 3, dan isotipe-isotipe faktor pertumbuhan ini kemungkinan dilepaskan pada saat proses *turnover* sel-sel epitel. Sel-sel endotel kornea yang normal juga turut memproduksi TGF- β 1, namun tidak memproduksi TGF- β 2. Pada kornea kelinci, protein TGF- β 1 atau TGF- β 2 diproduksi pada kadar yang rendah. TGF- β 2 tidak terdeteksi di dalam sel-sel epitel kornea, namun terdapat pada permukaan sel epitel dari kornea normal dan juga dideteksi pada permukaan stroma sesaat pasca prosedur *photorefractive keratectomy* (PRK) pada kelinci. Walaupun demikian, pasca cedera prosedur PRK pada kornea, protein TGF- β 1 dan TGF- β 2 dideteksi pada berbagai jenis sel stroma, di antaranya keratosit, fibroblas kornea, myofibroblas, dan beberapa sel-sel turunan sum-sum tulang. mRNA TGF- β 1 dan TGF- β 2 juga mengalami peningkatan regulasi pada sel-sel epitel dan endotel kornea yang berdekatan terhadap luka. TGF- β 2 LAP juga terdeteksi pada epitel dan stroma kornea manusia, dan TGF- β 3 LAP terdeteksi di dalam stroma subepitel (Wilson, 2021; Rocher et al., 2020).

Penelitian yang dilaporkan oleh Rocher *et al* (2020), pada kondisi patologis tertentu, kadar TGF- β yang menetap dapat berpotensi menimbulkan masalah karena dapat mempertahankan sel-sel myofibroblas yang terus mensekresi protein-protein matriks ekstraseluler dalam kadar yang berlebihan. Situasi ini dapat berujung pada fibrosis jaringan dan kondisi kekeruhan kornea, yang dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama bahkan setelah myofibroblas tidak lagi terdapat pada lokasi lesi. Efek dari kondisi patologis tersebut terhadap fungsi penglihatan

sangat bervariasi, mulai dari fotofobia dan astigmatisme ireguler hingga kebutaan pada beberapa kasus dengan fibrosis kornea yang terletak pada aksis penglihatan (Rocher et al., 2020).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Yi (2019) melaporkan bahwa ekspresi TGF- β dapat dihambat oleh antibiotik doksisisiklin pada tikus yang mengalami trauma basa berbanding terbalik dengan tingkat kekeruhan kornea (Yi and Zou, 2019). Penelitian oleh Okada (2014) menyampaikan bahwa tikus yang mengalami trauma basa dan diberikan antagonis yang dapat menghambat ekspresi TGF- β , mempunyai infiltrasi sel radang dan myofibroblas yang lebih sedikit. Pada pemeriksaan klinis menunjukkan ekspresi TGF- β yang lebih sedikit akan menghasilkan kornea yang lebih jernih pada observasi hari ke-20 (Okada et al., 2014). Pada penelitian lain dilaporkan bahwa semakin cepat terjadinya penyembuhan kornea dan luka dapat menutup sempurna akan menyebabkan ekspresi TGF- β yang menyebabkan sel myofibroblas di stroma akan mengalami apoptosis sehingga kekeruhan kornea akan berkurang (Bukowiecki et al., 2017; Torricelli et al., 2016). Pada studi lain dilaporkan apoptosis dipicu oleh TGF- β yang masuk ke stroma melalui kerusakan epitel dan aquos humor setelah terjadi cedera pada membran Descemet, dan memicu aktivitas fibroblas kornea sehingga akan mengubah komposisi, struktur, dan hidrasi stroma yang terkena dan menghasilkan kekeruhan stroma (Wilson et al., 2022).

Membran PRF adalah biomaterial fibrin yang banyak mengandung leukosit dan platelet. Membran PRF mampu melepaskan faktor pertumbuhan

utama yaitu TGF- β , PDGF, VEGF dan TSP-1 selama 7 hari. Rerata pelepasan TGF- β ditandai oleh adanya peningkatan pelepasan yang cepat dan signifikan dalam 24 jam pertama, selanjutnya akan melambat hingga hari ke-5. Penelitian yang dilakukan Ehrenfest *et al* melaporkan ekspresi TGF- β dan VEGF memiliki rasio antara pelepasan molekul yang dihambat dan yang diekstraksi cukup tinggi sehingga menunjukkan TGFb-1 dan VEGF yang dilepaskan oleh membran PRF memiliki kadar yang lebih banyak daripada jumlah awal yang tersedia di trombosit, hal ini dikarenakan komposisi membran PRF, TGFb-1 dan VEGF merupakan molekul yang paling banyak yang dihasilkan dan teraktivasi oleh leukosit. Leukosit merupakan sumber aktif faktor pertumbuhan dan menghasilkan TGF- β dan VEGF dalam jumlah banyak, dan leukosit juga berpengaruh pada membran PRF. Pelepasan sitokin yang lambat pada membran PRF sebagian mekanismenya diatur oleh leukosit yang berada didalam matriks fibrin PRF, sehingga menunjukkan bahwa pelepasan TGFb-1 dan VEGF dipengaruhi oleh stimulasi leukosit (Ehrenfest et al., 2010).

Penelitian ini menganalisis pengaruh pemberian membran PRF terhadap stimulasi ekspresi TGF- β . Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan pada rerata ekspresi TGF- β antara kelompok yang diberi antibiotik dan membran PRF dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi antibiotik saja. Pada lapisan epitel kornea kelompok antibiotik dan membran PRF didapatkan lebih sedikit dibandingkan kelompok antibiotik saja sehingga menunjukkan membran PRF dapat menurunkan ekspresi TGF- β , hal ini akan juga akan mempengaruhi

fibrosis jaringan dan kondisi kekeruhan kornea sehingga menghasilkan fungsi penglihatan yang baik pasca penyembuhan.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini mempunyai keterbatasan, yaitu diantaranya adalah periode observasi relatif pendek dengan diobservasi hingga hari ke-10 saja, tidak secara serial sehingga perbandingan ekspresi α -SMA dan TGF- β sesuai dengan fase penyembuhan luka tidak dapat dievaluasi. Pengukuran ekspresi α -SMA dan TGF- β tidak dilakukan sebelum operasi sehingga tidak dapat diketahui hasil pemeriksaan diberikan perlakuan. Penelitian ini tidak dapat mengevaluasi efektivitas membran PRF pada masing-masing fase penyembuhan luka oleh karena pengukuran ekspresi α -SMA dan TGF- β hanya diperoleh pada fase proliferasi penyembuhan luka. Selain itu, defek kornea pada penelitian ini bentuknya bervariasi walaupun dilakukan dengan metode induksi dan dosis inokulasi kuman yang seragam pada seluruh sampel.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Penelitian mengenai pengaruh pemberian membran *platelet rich fibrin* (PRF) terhadap ekspresi α -SMA dan TGF- β pada keratitis *Pseudomonas aeruginosa* (penelitian eksperimental pada *oryctolagus cuniculus*), dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian membran PRF menurunkan ekspresi α -SMA pada kornea hewan model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Pemberian membran PRF menurunkan ekspresi TGF- β pada epitel kornea hewan model keratitis *Pseudomonas aeruginosa*.

7.2 Saran

Saran pada penelitian ini adalah:

1. Melakukan observasi dan perlakuan dengan periode penelitian yang lebih lama sesuai proses penyembuhan luka pada penelitian selanjutnya.
2. Diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui mekanisme regulasi α -SMA dan TGF- β paska pemberian membran PRF untuk menunjang keputusan pengaplikasian dalam klinis.

3. Diperlukan penelitian lanjutan pada model hewan coba dengan inokulasi mikroorganisme lain penyebab tersering keratitis.



BAB 8

Penutup

Demikian telah dilakukan dan dilaporkan penelitian mengenai Pengaruh Pemberian Membran Platelet Rich Fibrin (PRF) terhadap ekspresi α -SMA dan TGF- β pada Keratitis *Pseudomonas aeruginosa* (Penelitian Eksperimental pada *Oryctolagus cuniculus*). Kritik dan saran yang membangun kami harapkan untuk penyempurnaan penelitian ini. Semoga penelitian ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akter, L., Salam, M., Hasan, B., Begum, N., Ahmed, I., 2010. Etiological agents of suppurative corneal ulcer: Study of 56 cases. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology* 3, 33–36. <https://doi.org/10.3329/bjmm.v3i2.5325>
- Alex Lap-Ki Ng, Kelvin Kai-Wang To, Chile Chi-Lai Choi, Leonard Hsu Yuen, Suk-Ming Yim, Keith Shun-Kit Chan, Jimmy Shiu-Ming Lai, and I.Y.-H.W., 2015. Predisposing Factors, Microbial Characteristics, and Clinical Outcome of Microbial Keratitis in a Tertiary Centre in Hong Kong: A 10-Year Experience. *Hindawi Journal of Ophthalmology* 9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/769436>
- Alicia Eby M. and Linda Hazlett D., 2016. *Pseudomonas Keratitis, a Review of Where We've Been and What Lies Ahead*. *J Microb Biochem Technol* 8:1. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000254>
- Asroruddin, M., Nora, R.L.D., Edwar, L., Sjamsoe, S., Susiyanti, M., 2015. Various factors affecting the bacterial corneal ulcer healing: A 4-years study in referral tertiary eye hospital in Indonesia. *Medical Journal of Indonesia* 24, 150–155. <https://doi.org/10.13181/mji.v24i3.1044>
- Bukowiecki, A., Hos, D., Cursiefen, C., Eming, S., 2017. Wound-Healing Studies in Cornea and Skin: Parallels, Differences and Opportunities. *Int J Mol Sci* 18, 1257. <https://doi.org/10.3390/ijms18061257>
- Can, M.E., Dereli Can, G., Cagil, N., Cakmak, H.B., Sungu, N., 2016. Urgent therapeutic grafting of platelet-rich fibrin membrane in descemetocoele. *Cornea* 35, 1245–1249. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000917>
- Cherng, S., Young, J., Ma, H., 2008. Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). *J Am Sci* 4, 7–9.
- Dakhil, T.A. Bin, Stone, D.U., Gritz, D.C., 2017. Adjunctive Therapies for Bacterial Keratitis. *Middle East Afr J Ophthalmol* 24, 11–17. https://doi.org/10.4103/meajo.MEAJO_264_16
- Dohan Ehrenfest, D.M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., Charrier, J.-B., 2010. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol* 81, 546–555. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090531>
- Drechsler, C.C., Kunze, A., Kureshi, A., Grobe, G., Reichl, S., Geerling, G., Daniels, J.T., Schrader, S., 2017. Development of a conjunctival tissue substitute on the basis of plastic compressed collagen. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 896–904. <https://doi.org/10.1002/term.1991>
- Ehrenfest, D.M.D., Andia, I., Zumstein, M.A., Zhang, C.Q., Pinto, N.R., Bielecki, T., 2014. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J* 4, 3–9. <https://doi.org/10.32098/mltj.01.2014.02>

- Gray, B., Huang, L. C., Garufis, C., Gwon, A. and Martiz, J.R., 2010. Biometric Analysis of the Rabbit Cornea-A Potential Model for Refractive Surgical Technology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(13).
- Hazlett, L., Suvas, S., McClellan, S., Ekanayaka, S., 2016. Challenges of corneal infections. *Expert Rev Ophthalmol* 11, 285–297. <https://doi.org/10.1080/17469899.2016.1203254>
- Hilliam, Y., Kaye, S., Winstanley, C., 2020. *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *J Med Microbiol* 69, 3–13. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001110>
- Ismi Zuhria, Nurwasis, Eddy Bagus Wasito, Winarto, I Ketut Sudiana, Reny I'tishom, & N.P., 2021. Mechanism of Corneal Epithelial Cells Death by Infection of *pseudomonas Aeruginosa* through Analysis Expression of Caspase-1, TNF, RIPK1, RIPK3, Caspase-3 in Rats Model. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.* 15(3), 3236–3246.
- Jorge L Alio, Alejandra E Rodriguez, Lorena M Martinez, A.L.R., 2013. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. *JAMA Ophthalmol* 745–751. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.2474>
- Kaemmerer, D., Peter, L., Lupp, A., Schulz, S., Sanger, J., Baum, R.P., Prasad, V., Hommann, M., 2012. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 5, 187–194.
- Kamil, S., Mohan, R.R., 2021. Corneal stromal wound healing: Major regulators and therapeutic targets. *Ocular Surface* 19, 290–306. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.10.006>
- Kementrian Kesehatan, 2015. Info Gangguan Penglihatan dan Kebutaan di Indonesia. Jakarta.
- Kheirkhah, A., Tabatabaei, A., Zavareh, M.K., Khodabandeh, A., Mohammadpour, M., Raju, V.K., 2012. A controlled study of amniotic membrane transplantation for acute *Pseudomonas* keratitis. *Canadian Journal of Ophthalmology* 47, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2012.03.014>
- Kim, S.Y., Lim, J.A., Choi, J.S., Choi, E.C., Joo, C.K., 2007. Comparison of antibiotic effect and corneal epithelial toxicity of levofloxacin and moxifloxacin in vitro. *Cornea* 26, 720–725. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3180515251>
- Kitamura, Y., Watanabe, T., Nakamura, M., Isobe, K., Kawabata, H., Uematsu, K., Okuda, K., Nakata, K., Tanaka, T., Kawase, T., 2018. Platelet Counts in Insoluble Platelet-Rich Fibrin Clots: A Direct Method for Accurate Determination. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00004>
- Kobayashi, M., K.T., O.K., W.L.F., and Y.H., 2015. ‘In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations.’ *Int. J. Implant. Dent.* <https://doi.org/10.1186/s40729-015-0032-0>
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N.A., 2017. Pathogenesis of microbial keratitis. *Microb Pathog* 104, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.013>

- Liju Yang, Cindy X. Qiu, A.L., Mark W. J. Ferguson, and G.B., 1999. Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay. *American Journal of Pathology* Vol. 154,. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65256-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65256-x)
- Livingston, E.T., Mursalin, M.H., Callegan, M.C., 2019. A pyrrhic victory: The PMN response to ocular bacterial infections. *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110537>
- Madsen, D.H., Jürgensen, H.J., Siersbæk, M.S., Kuczek, D.E., Grey Cloud, L., Liu, S., Behrendt, N., Grøntved, L., Weigert, R., Bugge, T.H., 2017. Tumor-Associated Macrophages Derived from Circulating Inflammatory Monocytes Degrade Collagen through Cellular Uptake. *Cell Rep* 21, 3662–3671. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.011>
- Mahmoudzadeh, R., Heidari-Keshel, S., Mehrpour, M., Asadi Amoli, F., Aghajani, L., Lashay, A., 2020. Comparison of Topical Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) with Topical Bevacizumab for Accelerating the Regression of Corneal Neovascularization in an Experimental Model of Rabbit Corneal Angiogenesis. *Ocul Immunol Inflamm* 00, 1–7. <https://doi.org/10.1080/09273948.2020.1751211>
- Malachkova, N., Kryvetska, N., Kryvetskyi, V., 2021. Modeling of bacterial keratitis of *Pseudomonas aeruginosa* etiology in the experimental model. *Ophthalmology Journal* 6, 17–22. <https://doi.org/10.5603/oj.2021.0007>
- Mehmet Erol Can, Gamze Dereli Can, Nurullah Cagil, Hasan Basri Cakmak, Sungu, and N., 2016. Urgent Therapeutic Grafting of Platelet-Rich Fibrin Membrane in Descemetocoele. *Cornea* 35, 1245–1249. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000917>
- Mihaylova, Z., Mitev, V., Stanimirov, P., Isaeva, A., Gateva, N., Ishkitiev, N., 2017. Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta Odontol Scand* 75, 1–11. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1236985>
- Miron, R.J., Pinto, N.R., Quirynen, M., Ghanaati, S., 2019. Standardization of relative centrifugal forces in studies related to platelet-rich fibrin. *J Periodontol* 90, 817–820. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0553>
- Mohan, S., Budhiraja, I., Saxena, A., Khan, P., Sachan, S.K., 2014. Role of multilayered amniotic membrane transplantation for the treatment of resistant corneal ulcers in North India. *Int Ophthalmol* 34, 485–491. <https://doi.org/10.1007/s10792-013-9834-3>
- Narsami, A.K., Jatoi, S.M., Lohana, M.K., Dabir, S.A., Gul, S., Khanzada, M.A., 2009. Hospital-base epidemiology, risk factors and microbiological diagnosis of bacterial corneal ulcer. *Int J Ophthalmol* 9, 409–413. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-5123.2009.03.002>
- Nimmy Raj, Noopur Gupta, Deepak Kumar, Praveen Vashist, R.T., 2021. Population-based study on the prevalence, clinical characteristics and vision-related quality of life in patients with corneal opacity resulting from infectious keratitis: results from the Corneal Opacity Rural Epidemiological study. *British Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2021-320077>

- Nishida, T., Sugioka, K., Fukuda, K., Murakami, J., 2021. Pivotal role of corneal fibroblasts in progression to corneal ulcer in bacterial keratitis. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22168979>
- Okada, Y., Shirai, K., Reinach, P.S., Kitano-Izutani, A., Miyajima, M., Flanders, K.C., Jester, J. v, Tominaga, M., Saika, S., 2014. TRPA1 is required for TGF- β signaling and its loss blocks inflammatory fibrosis in mouse corneal stroma. *Laboratory Investigation* 94, 1030–1041. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.85>
- Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V., Stojanovic, P., 2016. Platelet Rich Plasma: A short overview of certain bioactive components. *Open Medicine (Poland)* 11, 242–247. <https://doi.org/10.1515/med-2016-0048>
- Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V., Trandafilovic, M., Stojanovic, P., 2021. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Medicine (Poland)* 16, 446–454. <https://doi.org/10.1515/med-2021-0259>
- Pergolizzi, S., Marino, A., Capillo, G., Aragona, M., Marconi, P., Lauriano, E.R., 2020. Expression of Langerin/CD 207 and α -smooth muscle actin in ex vivo rabbit corneal keratitis model. *Tissue Cell* 66. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101384>
- Permatasari, D., Soebagjo, H.D., Zuhria, I., Kurniasari, N., Notobroto, H.B., Nandini, C., 2021. Cryotherapy Has No Significant Effect on MMP-9 and TGF- β 1 Expression in Fungal Corneal Ulcer. *Indones. Biomed. J.* 13, 295–302.
- Petrova, Y., Petrov, V., Georgieva, T.M., Ceciliani, F., 2018. Blood fibrinogen concentrations in New Zealand white rabbits during the first year of life. *Bulg J Vet Med* 21, 286–291. <https://doi.org/10.15547/bjvm.1064>
- Pižem, J., Cör, A., 2003. Detection of apoptotic cells in tumour paraffin sections. *Radiol Oncol* 37, 225–32.
- Prabawati, W.E., Suhendro, G., Retnowati, E., 2022. A First Step to Novel Approach for Treating Alkali Injury of the Cornea: Effect of Platelet Rich Fibrin Lysates on Cultured Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Limbal Stem Cell Proliferation Exposed by Sodium Hydroxide. *Folia Medica Indones.* 58, 150–155.
- Putra, I., Rabiee, B., Anwar, K.N., Gidfar, S., Shen, X., Babalooee, M., Ghassemi, M., Afsharkhamseh, N., Bakhsh, S., Missiakas, D., Nezamabadi, A., Milani, B., Eslani, M., Djalilian, A.R., 2019. Staphylococcus aureus alpha-hemolysin impairs corneal epithelial wound healing and promotes intracellular bacterial invasion. *Exp Eye Res* 181, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.02.019>
- Ritika Mukhija, Noopur Gupta, Praveen Vashist, Radhika Tandon, S.K.G., 2020. Population-based assessment of visual impairment and pattern of corneal disease: results from the CORE (Corneal Opacity Rural Epidemiological) study. *British Journal of Ophthalmology* 104(7), 994–998. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314720>
- Rocher, M., Robert, P.Y., Desmoulière, A., 2020. The myofibroblast, biological activities and roles in eye repair and fibrosis. A focus on healing mechanisms in avascular cornea. *Eye (Basingstoke)* 34, 232–240. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0684-8>

- Ryoichi Mori, Katsuya Tanaka, I.S., 2018. Identification and functional analysis of inflammation related miRNAs in skin wound repair. *Development, Growth, Differentiation* 60(6), 306–315. <https://doi.org/10.1111/dgd.12542>
- Salmon, J.F., 2020. *Kanski's Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*, Ninth edit. ed. Elsevier, Edinburgh.
- Seth R Flaxman, Rupert R A Bourne, Serge Resnikoff, Peter Ackland, Tasanee Braithwaite, Maria V Cicinelli, Aditi Das, Jost B Jonas, Jill Keeffe, John H Kempen, Janet Leasher, Hans Limburg, Kovin Naidoo, Konrad Pesudovs, Alex Silvester, Gretchen A Stevens, 2017. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 5(12), e1221–e34. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30393-5)
- Sharma, N., Vajpaye, R.B., 2008. *Corneal Ulcers: Diagnosis and Management*, First Edit. ed. Jaypee Brothers, New Delhi.
- Singh, V., Barbosa, F.L., Torricelli, A.A.M., Santhiago, M.R., Wilson, S.E., 2014. Transforming growth factor β and platelet-derived growth factor modulation of myofibroblast development from corneal fibroblasts in vitro. *Exp. Eye Res.* 120, 152–160.
- Spurlin III, J.W., Lwigale, P.Y., 2013. Wounded Embryonic Corneas Exhibit Nonfibrotic Regeneration and Complete Innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 6334–6344. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12504>
- Srinivasan, M., 2012. *Keratitis*. Intech, Rijeka, Croatia.
- Stamate Alina-Cristina, Tătaru Călin Petru, Z.M., 2019. Update on surgical management of corneal ulceration and perforation. *Rom J Ophthalmol* 63, 166–173. <https://doi.org/10.22336/rjo.2019.25>
- Susan Standring; Henry Gray, 2008. *Gray's Anatomy : the anatomical basis of clinical practice*, 40th editi. ed. Churchill Livingstone/Elsevier.
- Torricelli, A.A.M., Santhanam, A., Wu, J., Singh, V., Wilson, S.E., 2016. The corneal fibrosis response to epithelial–stromal injury. *Exp Eye Res* 142, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.012>
- Utomo, D.N., Chilmi, M.Z., Fiandana, A., 2019. Effect Of Platelet Rich Fibrin And Mesenchymal Stem Cell On Myoblast And Fibroblasts Ratio In Rabbit Muscle Defect. *J. Orthop. Traumatol. Surabaya* 7, 95.
- Vazirani, J., Wurity, S., Ali, M.H., 2015. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *Ophthalmology* 122, 2110–2114. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2015.06.007>
- Verrecchia, F., Mauviel, A., 2007. Transforming growth factor- β and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13, 3056. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i22.3056>
- Watanabe, T., Isobe, K., Suzuki, T., Kawabata, H., Nakamura, M., Tsukioka, T., Okudera, T., Okudera, H., Uematsu, K., Okuda, K., Nakata, K., Kawase, T., 2017. An Evaluation of the Accuracy of the Subtraction Method Used for Determining Platelet Counts in Advanced Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factor Preparations. *Dent J (Basel)* 5, 7. <https://doi.org/10.3390/dj5010007>

- Weisenthal, R. W., Daly, M. K., De Freitas, D., 2019. External disease and cornea, Section 8. ed. American Academy of Ophthalmology, San Fransisco.
- Wilson, S.E., 2021. Interleukin-1 and transforming growth factor beta: commonly opposing, but sometimes supporting, master regulators of the corneal wound healing response to injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62. <https://doi.org/10.1167/IOVS.62.4.8>
- Wilson, S.E., 2020. Corneal wound healing. *Exp. Eye Res.* 197, 108089.
- Wilson, S.E., Sampaio, L.P., Shiju, T.M., Hilgert, G.S.L., de Oliveira, R.C., 2022. Corneal Opacity: Cell Biological Determinants of the Transition From Transparency to Transient Haze to Scarring Fibrosis, and Resolution, After Injury. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 63, 22.
- Yi, Q., Zou, W., 2019. The Wound Healing Effect of Doxycycline after Corneal Alkali Burn in Rats. *J Ophthalmol* 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/5168652>

LAMPIRAN**Lampiran 1****ORGANISASI PENELITIAN**

Pembimbing I	: Dr. Nurwasis, dr., SpM(K)
Pembimbing II	: Dr. Evelyn Komaratih, dr., SpM(K)
Koordinator Penelitian	: Dr. Luki Indriaswati, dr., SpM(K)
Peneliti	: 1. Bimanda Rizki Nurhidayat, dr. 2. Nandang Sudrajat, dr. 3. Oggy Satriya Putra, dr.
Pembantu Penelitian	: Petugas laboratorium departemen Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Lampiran 2

ANGGARAN PENELITIAN

No	Material	Kuantitas	Harga
1	Kelinci New Zealand	12 ekor	Rp. 6.000.000
2	Perawatan kelinci	2 minggu	Rp. 1.500.000
3	Anestesi hewan coba	12 ekor	Rp. 1.200.000
4	Alat dan bahan habis pakai operasi penjahitan PRF		Rp. 4.800.000
5	VEGF <i>monoclonal antibody</i>		Rp. 5.900.000
6	PEDF <i>antibody</i>		Rp. 4.500.000
7	PRF box	1 unit	Rp. 2.200.000
8	Isolat <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Rp. 350.000
9	Pemeriksaan imunohistokimia	12 ekor	Rp. 4.800.000
10	Pemeriksaan hematologi	6 ekor	Rp. 960.000
11	Fotocopy dan print		Rp. 2.250.000
12	Publikasi		Rp. 8.000.000
	Total Pengeluaran		Rp. 42.810.000

Lampiran 3

JADWAL PENELITIAN

Kegiatan	2021		2022								
Bulan	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Penelusuran kepustakaan											
Penyusunan usulan penelitian											
Pengajuan usulan penelitian											
Pengumpulan data											
Pengolahan data											
Penyusunan laporan penelitian											
Penyajian laporan penelitian											

Lampiran 4

KELAIKAN ETIK

KEH FKH Unair




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

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 2.KEH.026.03.2022

**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 PEMBERIAN MEMBRAN PLATELET RICH FIBRIN
TERHADAP EKSPRESI A-SMOOTH MUSCLE ACTIN DAN
TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA PADA KERATITIS
INFEKTIF BAKTERIAL (STUDI EKSPERIMENTAL PADA
ORYCTALOGUS CUNICULUS)

PENELITI UTAMA : Bimanda Rizki Nurhidayat

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

DINYATAKAN : LAIK ETIK

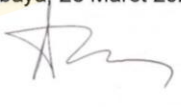
Surabaya, 28 Maret 2022

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Dr. Mimi Lamid, M.P., Drh.
NIP. 196201161992032001

Ketua,



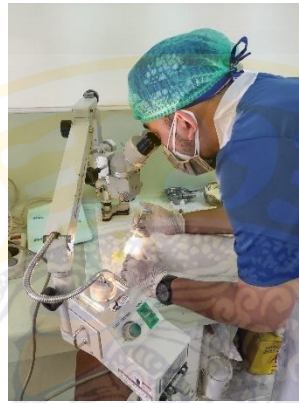
Dr. Nurdianto Triakoso, M.P., Drh.
NIP. 196805051997021001

Lampiran 5

DOKUMENTASI PENELITIAN



Gambar 1. Evaluasi segmen anterior



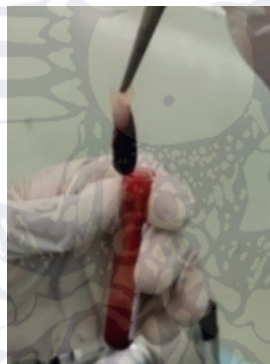
Gambar 2. Proses induksi keratitis



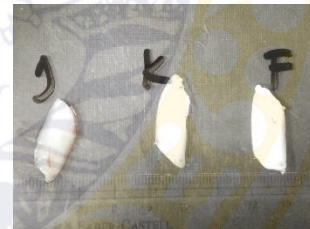
Gambar 3. Dokumentasi permukaan bola mata



Gambar 3. Sampel darah post sentrifugasi



Gambar 4. Pengambilan PRF



Gambar 5. Membran PRF yang siap diaplikasikan



Gambar 6. Proses penjahitan membran PRF



Gambar 7. Membran PRF terjahit pada kornea kelinci



Gambar 8. Organ mata post enukleasi

Lampiran 6

ANALISIS DATA PENELITIAN

1. Uji normalitas data ekspresi α -SMA dan TGF- β

Tests of Normality							
	GROUP	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TGF_KORNEA	K1	.158	6	.200 [*]	.940	6	.662
	K2	.373	6	.009	.702	6	.006
ALPHA_KORNEA	K1	.211	6	.200 [*]	.920	6	.509
	K2	.289	6	.127	.751	6	.020

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

2. Mann-whitney test ekspresi α -SMA dan TGF- β

Test Statistics ^a		
	TGF_KORNEA	ALPHA_KORNEA
	A	NEA
Mann-Whitney U	6.000	4.500
Wilcoxon W	27.000	25.500
Z	-1.925	-2.169
Asymp. Sig. (2-tailed)	.054	.030
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 ^b	.026 ^b

a. Grouping Variable: GROUP
b. Not corrected for ties.

3. *Mann-whitney test* ekspresi TGF- β pada epitel dan endotel

Test Statistics ^a		
	TGF EPITEL	TGF ENDOTEL
Mann-Whitney U	.000	16.000
Wilcoxon W	21.000	37.000
Z	-2.994	-.332
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003	.740
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.818 ^b

a. Grouping Variable: GROUP
b. Not corrected for ties.

4. *Independent t test* ekspresi TGF- β pada stroma

Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower Upper
LNK2TGFSTROMA	Equal variances assumed	3.809	.087	-.813	8	.440	-.91089	1.12043	-3.49462 1.67283
	Equal variances not assumed			-.677	3.477	.541	-.91089	1.34570	-4.87979 3.05800