

TESIS

PENGARUH ENZIM TRANSGLUTAMINASE SEBAGAI *CORNEAL COLLAGEN CROSSLINKING* TERHADAP KETEBALAN KORNEA SENTRAL DAN DENSITAS KERATOSIT KORNEA

(Studi Eksperimental pada Kelinci Putih *New Zealand*)



Oleh :

Puspita Hapsari Sitorasmi

NIM. 012115653093

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

TESIS

PENGARUH ENZIM TRANSGLUTAMINASE SEBAGAI *CORNEAL COLLAGEN CROSSLINKING* TERHADAP KETEBALAN KORNEA SENTRAL DAN DENSITAS KERATOSIT KORNEA

(Studi Eksperimental pada Kelinci Putih *New Zealand*)



Oleh :

Puspita Hapsari Sitorasmi

NIM. 012115653093

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

**PENGARUH ENZIM TRANSGLUTAMINASE SEBAGAI
CORNEAL COLLAGEN CROSSLINKING
TERHADAP KETEBALAN KORNEA SENTRAL DAN
DENSITAS KERATOSIT KORNEA**

(Studi Eksperimental pada Kelinci Putih *New Zealand*)

TESIS

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelar Magister Kedokteran Klinik
(M.Ked.Klin)

Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga

Oleh :

Puspita Hapsari Sitorasmi

NIM. 012115653093

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

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan proposal tesis yang berjudul:

**PENGARUH ENZIM TRANSGLUTAMINASE SEBAGAI
CORNEAL COLLAGEN CROSSLINKING
TERHADAP KETEBALAN KORNEA SENTRAL DAN
DENSITAS KERATOSIT KORNEA**

(Studi Eksperimental pada Kelinci Putih *New Zealand*)

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelar Magister Kedokteran Klinik
(M.Ked. Klin)

Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Megister
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

Puspita Hapsari Sitorasmi, dr.

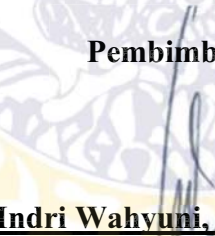
Pembimbing I



Dr. Yulia Primitasari, dr., SpM(K)

NIP. 197307012005012001

Pembimbing II

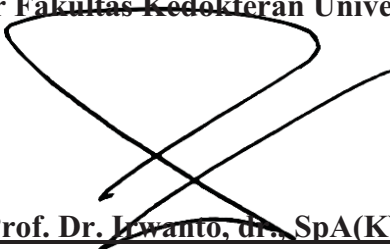


Indri Wahyuni, dr., SpM(K)

NIP. 197710172008122001

Mengetahui,

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



Prof. Dr. Irwanto, dr., SpA(K)

NIP. 196502271990031010

HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI HASIL TESIS

Laporan hasil penelitian tesis ini diajukan oleh:

Nama : Puspita Hapsari Sitorasmi, dr
Nim : 012115653093
Program studi : Ilmu Kesehatan Mata
Judul : Pengaruh Enzim Transglutaminase sebagai *Corneal Collagen Crosslinking* Terhadap Ketebalan Kornea Sentral dan Densitas Keratosit Kornea (Studi Eksperimental Pada Kelinci Putih *New Zealand*)

Ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo Pada tanggal 28 November 2022.

Panitia Penguji:

1. Ketua penguji : Dr. Reni Prastyani, dr., Sp.M, M.Kes
2. Penguji : Dr. Yulia Primitasari, dr., Sp.M (K)
3. Penguji : Indri Wahyuni, dr., Sp.M (K)
4. Penguji : Dr. Luki Indriaswati, dr., SpM(K)
5. Penguji : Dr. Mahmudah, Ir., M.Kes

PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS

Yang bertandatangan di bawah ini

Nama : dr. Puspita Hapsari Sitorasmi

NIM : 012115653093

Program Studi: Ilmu Kesehatan Mata

Angkatan : Juli 2018

Jenjang : PPDS-1

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan kegiatan plagiat dalam hasil penelitian saya yang berjudul:

Pengaruh Enzim Transglutaminase sebagai *Corneal Collagen Crosslinking* Terhadap Ketebalan Kornea Sentral dan Densitas Keratosit Kornea (Studi Eksperimental Pada Kelinci Putih *New Zealand*)

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, 7 November 2022

Penulis



Puspita Hapsari Sitorasmi

NIM. 011818016307

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT dengan selesainya hasil penelitian tesis ini dengan judul **“Pengaruh Enzim Transglutaminase sebagai *Corneal Collagen Crosslinking* Terhadap Ketebalan Kornea Sentral dan Densitas Keratosit Kornea (Studi Eksperimental Pada Kelinci Putih *New Zealand*)”**. Saya haturkan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

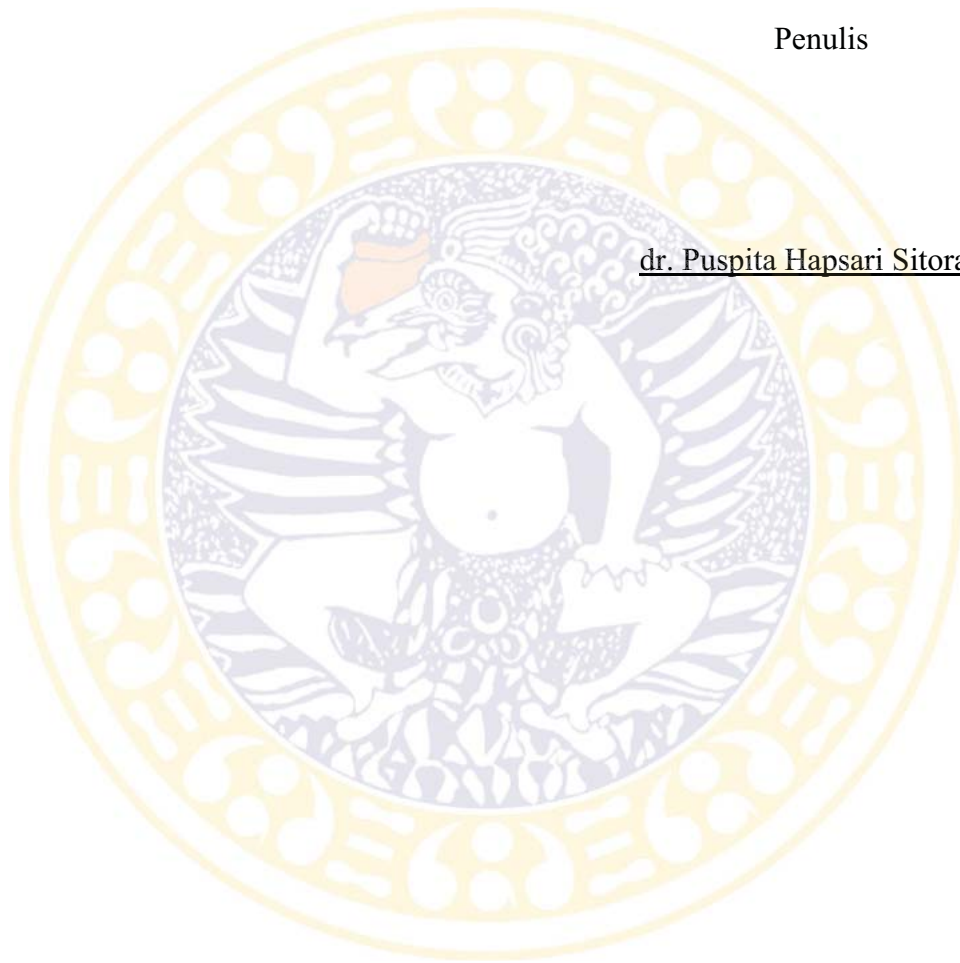
1. Dr. Yulia Primitasari, dr., SpM(K) sebagai pembimbing I dan Koordinator Program Studi PPDS-I Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya dalam penelitian ini yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan membuka pola pikir penulis dalam penyusunan proposal tesis ini.
2. Indri Wahyuni, dr., SpM(K) sebagai pembimbing II yang telah memberikan banyak koreksi dan bimbingan dalam pelaksanaan hingga penulisan proposal tesis ini.
3. Dr. Evelyn Komaratih, dr., SpM(K) sebagai Ketua Departemen/KSM Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang telah memberikan kesempatan untuk ditampilkannya proposal tesis ini.
4. Dr. Luki Indriaswati, dr., SpM(K), Dr. Reni Prasetyani, dr., SpM., MKes, Rozalina Loebis, dr., SpM(K), dan Sauli Ari Widjaja, dr., SpM(K) selaku koordinator penelitian yang telah memberikan motivasi dan arahan dalam penyusunan proposal tesis ini.

5. Dr. Ir. Mahmudah, M.Kes sebagai konsultan statistika yang telah memberikan bimbingan mengenai statistika dan konsep penelitian dalam penyusunan proposal tesis ini.
6. Djoko Legowo, drh., M.Kes sebagai konsultan Patologi Anatomi yang telah memberikan bimbingan dan konsep penelitian dalam penyusunan proposal tesis ini.
7. Dicky Hermawan, dr., SM(K), selaku Bapak Pembimbing Akademik, atas bimbingan dan motivasinya.
8. Para Guru Besar dan Staf Pengajar Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang telah banyak membimbing dan memberikan saran selama penyusunan proposal tesis ini.
9. **Bapak/Ibu moderator dan sekretaris sidang** yang telah memimpin jalannya pementasan proposal tesis ini.
10. **Teman-teman sejawat PPDS I Ilmu Kesehatan Mata**, yang selalu memberikan dorongan, semangat, dan bantuan dalam penyusunan proposal tesis ini.
11. **Teman-teman PPDS Mata Angkatan Juli 2018** teman seperjuangan yang selalu memberikan dukungan untuk penyelesaian proposal tesis ini
12. **Kedua orang tua saya, suami, anak, dan saudara-saudara** atas segala doa, semangat dan dukungan yang tidak pernah putus kepada saya selama menjalani masa pendidikan.

Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu atas semua bantuannya sehingga terselesaikannya usulan penelitian ini, tidak lupa kami haturkan banyak terima kasih. Semoga amal baiknya diberikan balasan yang seetimpal dan selalu mendapatkan berkah dan rahmat dari Allah SWT.

Penulis

dr. Puspita Hapsari Sitorasmi



RINGKASAN

Pengaruh Enzim Transglutaminase Sebagai *Corneal Collagen Crosslinking* Terhadap Ketebalan Kornea Sentral dan Densitas Keratosit

Puspita Hapsari Sitorasmi, Indri Wahyuni, Yulia Primitasari

Corneal collagen crosslinking merupakan suatu prosedur untuk membuat ikatan yang menghubungkan rantai polimer satu dengan lainnya. *Corneal collagen crosslinking* bertujuan memperlambat atau menghentikan progresi keratokonus dengan menggunakan terapi fotooksidatif sehingga dapat meningkatkan rigiditas stroma. *Corneal collagen crosslinking* konvensional menggunakan riboflavin dan ultraviolet-A (UVA) akan menghasilkan ikatan silang melalui dua jaras, yaitu jaras oksidatif dan glikosilasi.

Enzim transglutaminase saat ini banyak digunakan pada industri makanan. Studi-studi terkini menunjukkan bahwa mRNA, fibronectin, dan transglutaminase ditemukan lebih banyak pada keratosit kornea manusia yang diterapi dengan UVA dan riboflavin. Saat ini terdapat suatu bahan enzimatik yang dapat digunakan sebagai salah satu pilihan untuk melakukan CXL, yaitu enzim transglutaminase. Produk enzimatik, berupa transglutaminase dinilai dapat mengurangi rasa tidak nyaman akibat penyinaran UVA, serta dapat menghambat kematian sel keratosit.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh enzim transglutaminase sebagai *corneal collagen crosslinking* terhadap ketebalan kornea sentral dan densitas keratosit. Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan *post-testonly design* pada hewan coba kelinci untuk membandingkan respon pemberian enzim transglutaminase dengan riboflavin/UVA *epithelial-off* dan *transepithelial*.

Pada penelitian ini menggunakan mata kelinci putih New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) dewasa, jenis kelamin jantan, usia 3-4 bulan dengan berat badan 3-4 kg. Penelitian ini memerlukan masing-masing 7 mata untuk kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif, sehingga dibutuhkan total kelinci sebanyak 28 ekor. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak didapatkan perbedaan signifikan pada ketebalan kornea sentral antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (*p-value* 0.990). Penelitian ini juga menilai densitas keratosit, dimana terdapat perbedaan bermakna antar kelompok dengan *p-value* 0.009.

Tidak didapatkan perbedaan signifikan pada ketebalan kornea sentral antar kelompok, hal ini dapat disebabkan oleh remodeling epitel dan edema stroma terjadi beberapa hari setelah perlakuan, maka peningkatan ketebalan kornea akan membutuhkan waktu yang lebih lama. Penelitian ini juga didapatkan perbedaan densitas keratosit yang signifikan pada kelompok perlakuan, hal ini dapat disebabkan oleh UVA yang merupakan salah satu prosedur dari CXL konvensional dapat menginduksi reaksi fotokimia yang dapat mengurangi densitas keratosit. UVA dapat menginduksi *reaktif oxygen species* (ROS) yang tidak hanya mengakibatkan terjadinya *crosslinking* pada kolagen, tetapi juga dapat mengakibatkan nekrosis maupun apoptosis dari sel-sel pada bola mata, salah satunya adalah keratosit pada stroma kornea.

SUMMARY

Effect of Transglutaminase Enzyme as Corneal Collagen Crosslinking on Central Corneal Thickness and Density of Keratocytes

Puspita Hapsari Sitorasmi, Indri Wahyuni, Yulia Primitasari

Corneal collagen crosslinking is a procedure for making bonds that connect polymer chains to one another. Corneal collagen crosslinking aims to slow or stop the progression of keratoconus by using photooxidative therapy so as to increase stromal rigidity. Conventional corneal collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet-A (UVA) will result in crosslinking through two pathways, namely oxidative and glycosylation pathways.

Transglutaminase enzymes are currently widely used in the food industry. Recent studies have shown that mRNA, fibronectin, and transglutaminase were found to be more abundant in human corneal keratocytes treated with UVA and riboflavin. Currently, there is an enzymatic material that can be used as an option to perform CXL, namely the transglutaminase enzyme. The enzymatic product, in the form of transglutaminase, is considered to reduce discomfort caused by UVA irradiation, and can inhibit keratocyte cell death.

This study aims to analyze the effect of transglutaminase enzyme as corneal collagen crosslinking on central corneal thickness and keratocyte density. This study is a true experimental study with a post-test-only design in rabbits to compare the response of transglutaminase to riboflavin/UVA epithelial-off and transepithelial.

In this study, the eyes of an adult New Zealand white rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) were used, male sex, 3-4 months old and weighing 3-4 kg. This study required 7 eyes each for the treatment group and the negative control group, so a total of 28 rabbits were needed. The results of this study showed that there was no significant difference in central corneal thickness between the treatment group and the control group (p-value 0.990). This study also assessed the density of keratocytes, where there was a significant difference between groups with a p-value of 0.009.

There was no significant difference in central corneal thickness between groups, this could be due to epithelial remodeling and stromal edema occurring several days after treatment, so the increase in corneal thickness would take a longer time. This study also found significant differences in the density of keratocytes in the treatment group, this could be caused by UVA which is one of the conventional CXL procedures that can induce photochemical reactions that can reduce the density of keratocytes. UVA can induce reactive oxygen species (ROS) which not only results in crosslinking of collagen, but can also cause necrosis and apoptosis of cells in the eyeball, one of which is keratocytes in the corneal stroma.

ABSTRACT

Effect of Transglutaminase Enzyme as Corneal Collagen Crosslinking on Central Corneal Thickness and Density of Keratocytes

Puspita Hapsari Sitorasmi, Indri Wahyuni, Yulia Primitasari

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine Universitas Airlangga/ Dr. Soetomo General Hospital, Surabaya, Indonesia

Background: Corneal collagen crosslinking is a procedure for making bonds that connect polymer chains to one another. Corneal collagen crosslinking aims to slow or stop the progression of keratoconus by using photooxidative therapy so as to increase stromal rigidity. Transglutaminase enzymes are currently widely used in the food industry. Recent studies have shown that mRNA, fibronectin, and transglutaminase were found to be more abundant in human corneal keratocytes treated with UVA and riboflavin. Currently, there is an enzymatic material that can be used as an option to perform CXL, namely the transglutaminase enzyme. The enzymatic product, in the form of transglutaminase, is considered to reduce discomfort caused by UVA irradiation, and can inhibit keratocyte cell death.

Methods: This study is a true experimental study with a post-test-only design in rabbits to compare the response of transglutaminase to riboflavin/UVA epithelial-off and transepithelial. New Zealand white rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) were used, male sex, 3-4 months old and weighing 3-4 kg. This study required 7 eyes each for the treatment group and the negative control group.

Results: The results of this study showed that there was no significant difference in central corneal thickness between the treatment group and the control group (p-value 0.990). This study also assessed the density of keratocytes, where there was a significant difference between groups with a p-value of 0.009.

Conclusion: There was no significant difference in central corneal thickness between groups, this could be due to epithelial remodeling and stromal edema occurring several days after treatment, so the increase in corneal thickness would take a longer time. This study also found significant differences in the density of keratocytes in the treatment group, this could be caused by UVA which is one of the conventional CXL procedures that can induce photochemical reactions that can reduce the density of keratocytes.

Keyword: Transglutaminase, Corneal Collagen Crosslinking, Central Corneal Thickness, Keratocytes Density

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PENGESAHAN PENGUJI HASIL TESIS	v
PERNYATAAN ORISINALITAS	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum.....	3
1.3.2 Tujuan khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat teoritis.....	3
1.4.2 Manfaat praktis	4
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Anatomi Kornea.....	5
2.2 Biomekanika Kornea.....	7
2.3 Histologi Kornea	7
2.3.1 Histologi stroma	8
2.3.2 Densitas keratosit.....	9
2.4 Ketebalan Kornea Sentral	11
2.4.1 Pengukuran ketebalan kornea sentral	11
2.5 Ektasia Kornea	13
2.5.1 Keratokonus.....	13
2.5.2 <i>Pellucid Marginal Degeneration</i>	16
2.5.3 Ektasia pascabedah refraktif.....	17
2.6 <i>Corneal Collagen Crosslinking</i>	18

2.6.1 Ketebalan kornea sentral pasca CXL.....	21
2.6.2 Densitas keratosit pasca CXL.....	22
2.7 Transglutaminase	23
2.7.1 Transglutaminase dalam CXL	24

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual.....	25
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual.....	26
3.3 Hipotesis	27

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	28
4.1.1 Jenis penelitian	28
4.1.2 Rancangan penelitian.....	28
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.3 Sampel Penelitian, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel.....	29
4.3.1 Sampel penelitian	29
4.3.2 Besar sampel.....	29
4.3.3 Teknik pengambilan sampel	30
4.4 Kriteria Drop Out Sampel	30
4.5 Variabel Penelitian	30
4.5.1 Variabel bebas	30
4.5.2 Variabel tergantung	30
4.6 Definisi Operasional	31
4.7 Sarana Penelitian.....	32
4.8 Alat dan Bahan penelitian	32
4.9 Protokol Penelitian.....	33
4.10 Cara Kerja	34
4.10.1 Perlakuan <i>crosslinking</i> Riboflavin/UVA	34
4.10.2 Perlakuan <i>crosslinking</i> transglutaminase.....	35
4.10.3 Pemeriksaan biomekanis dengan <i>Corneal Visualization</i> <i>Scheimflug</i>	36
4.10.4 Pemeriksaan histopatologi	36
4.11 Analisis Data	37
4.11.1 Analisis deskriptif	37
4.11.2 Analisis statistik inferensial	37
4.12 Etika Penelitian	37

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Sampel Penelitian.....	38
5.2 Ketebalan Kornea Sentral	41
5.3 Ketebalan Kornea Sentral Berdasarkan Histopatologi.....	43

5.4 Densitas Keratosit	46
------------------------------	----

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 <i>Corneal Collagen Crosslinking</i>	50
6.2 Ketebalan Kornea Sentral	51
6.3 Densitas Keratosit	55
6.4 Keterbatasan Penelitian	57

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan	59
7.2 Saran	59

DAFTAR PUSTAKA	60
-----------------------------	----

LAMPIRAN	64
-----------------------	----

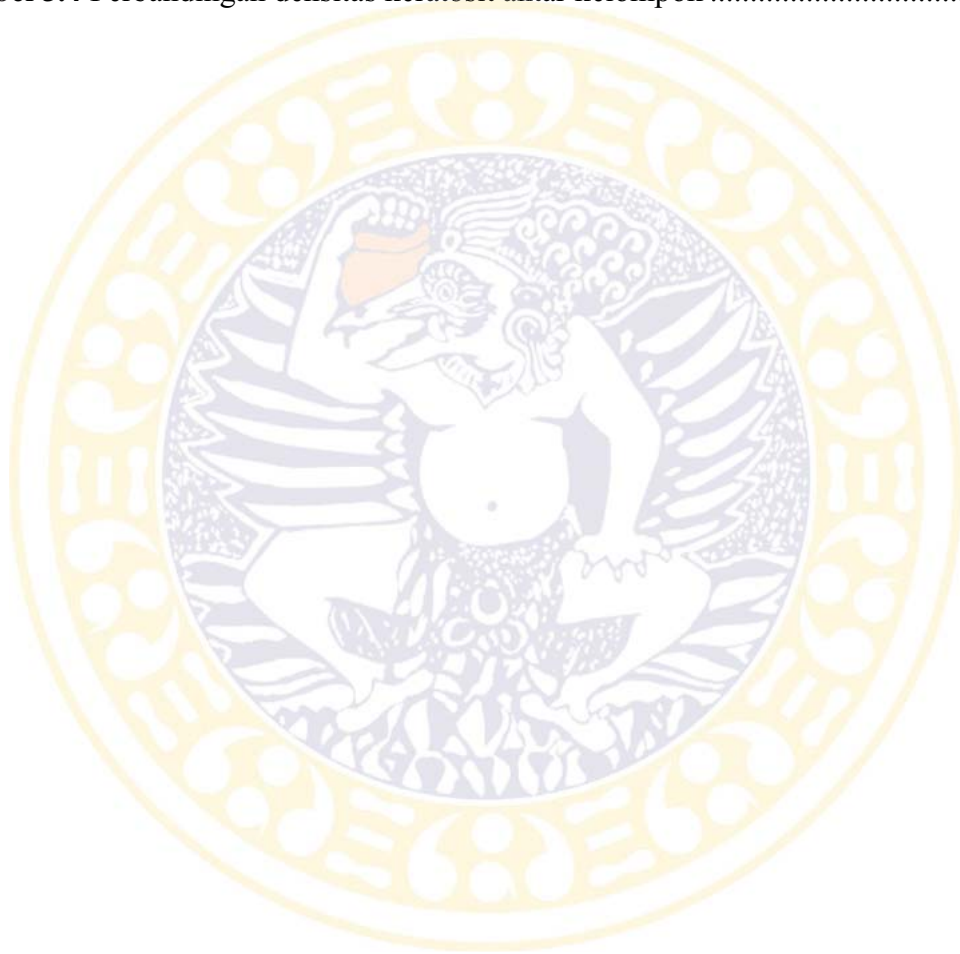


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Lapisan kornea.....	6
Gambar 2.2 Gambaran histologi keratosit.....	8
Gambar 2.3 Gambaran tiga dimensi keratosit tikus	9
Gambar 2.4 Gambaran epitel dan keratosit pada keratokonus	10
Gambar 2.5 <i>Corneal Visualization Scheimpflug Technology</i>	12
Gambar 2.6 Hasil pengukuran dengan scheimpflug	13
Gambar 2.7 <i>Fleischer ring</i> pada keratokonus	14
Gambar 2.8 Edema kornea	15
Gambar 2.9 Topografi kornea pada keratokonus	15
Gambar 2.10 PMD pada stadium awal dan lanjut.....	16
Gambar 2.11 Topografi kornea pada PMD	17
Gambar 3.1 Kerangka konseptual	25
Gambar 4.1 Rancangan penelitian.....	28
Gambar 4.2 Protokol penelitian.....	33
Gambar 5.1 Proses debridement epitel kornea	40
Gambar 5.2 Proses iradiasi UVA	40
Gambar 5.3 Gambaran segmen anterior pada hari-14.....	41
Gambar 5.4 Pemeriksaan ketebalan kornea sentral dengan <i>schiempflug</i>	42
Gambar 5.5 Hasil pemeriksaan ketebalan kornea sentral.....	42
Gambar 5.6 Grafik ketebalan kornea sentral dengan Corvis ST	43
Gambar 5.7 Grafik ketebalan kornea sentral dengan histopatologi	44
Gambar 5.8 Gambaran kornea secara histopatologi.....	45
Gambar 5.9 Perbandingan ketebalan kornea sentral	46
Gambar 5.10 Grafik nilai rata-rata jumlah sel keratosit.....	47
Gambar 5.11 Perbandingan densitas keratosit antar kelompok	48
Gambar 5.12 Grafik nilai rata-rata densitas sel keratosit	49

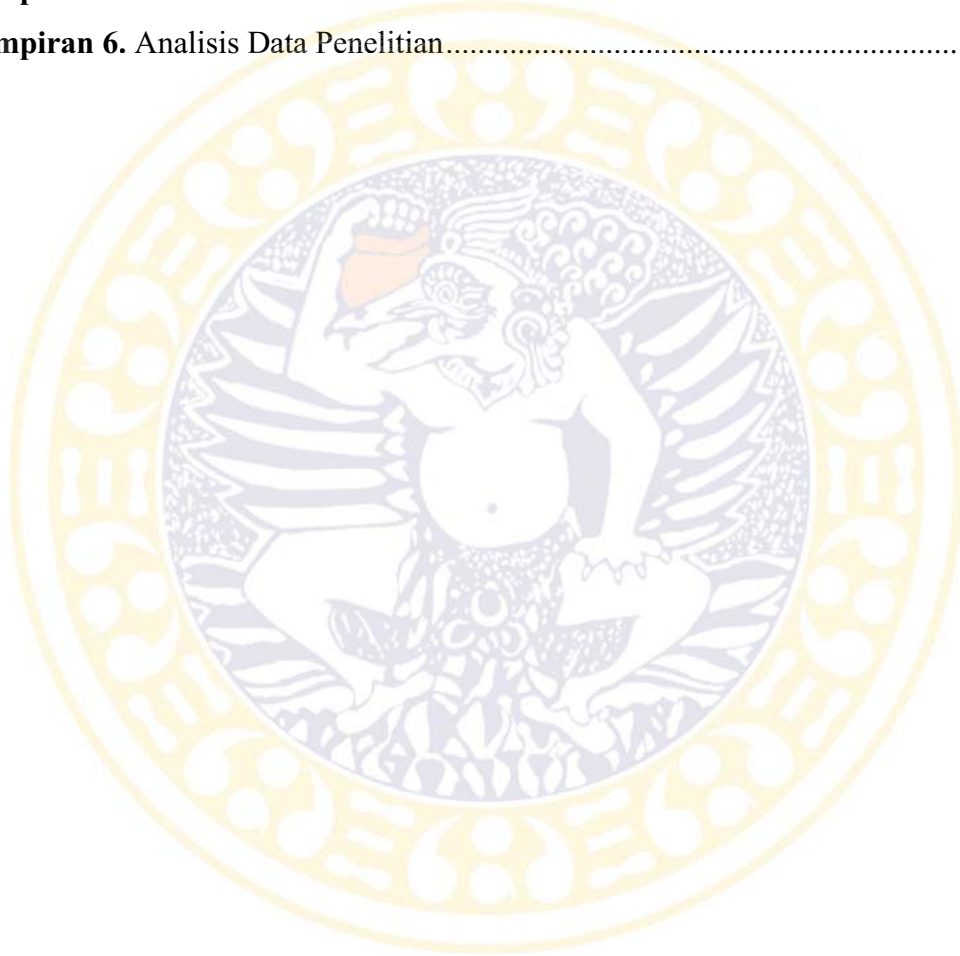
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Variabel penelitian dan definisi operasional	31
Tabel 5.1 Perbandingan ketebalan kornea sentral antar kelompok	43
Tabel 5.2 Perbandingan ketebalan kornea sentral secara histopatologi	45
Tabel 5.3 Perbandingan rerata jumlah keratosit antar kelompok	47
Tabel 5.4 Perbandingan densitas keratosit antar kelompok	49



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Organisasi penelitian.....	64
Lampiran 2. Anggaran Dana	65
Lampiran 3. Jadwal penelitian.....	66
Lampiran 4. Etik Penelitian.....	67
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	68
Lampiran 6. Analisis Data Penelitian.....	69



DAFTAR SINGKATAN

ATP	:	<i>Adenosin triphosphate</i>
DALK	:	<i>Deep anterior lamellar</i>
ECM	:	<i>Extracellular matrix</i>
EDTA	:	<i>Ethylenediaminetetraacetic</i>
K	:	Kalium
LASIK	:	<i>Laser in situ keratomileusis</i>
mm	:	milimeter
MMP	:	<i>Matrix metalloproteinase</i>
μm	:	mikrometer
mRNA	:	<i>messenger RNA</i>
nm	:	nanometer
Na	:	Natrium
NaI	:	Natrium Iodida
OCT	:	<i>Optical Coherence Tomography</i>
PBS	:	<i>Phosphate-Buffer Solution</i>
PMD	:	<i>Pellucid Marginal Degeneration</i>
PK	:	<i>Penetrating Keratoplasty</i>
RGP	:	<i>Rigid Glass Permeable</i>
UVA	:	<i>Ultraviolet-A</i>