

DAFTAR ISI

Sampul luar	i
Sampul dalam	ii
Awal disertasi	iii
Prasyarat gelar	iv
Pengesahan	v
Penetapan panitia penguji	vi
Ucapan terima kasih	vii
Ringkasan	xiv
<i>Summary</i>	xvi
<i>Abstract</i>	xviii
Daftar isi	xix
Daftar tabel	xxv
Daftar gambar	xxvi
Daftar lampiran	xxxii
Daftar singkatan	xxxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan.....	8
1.3.1 Tujuan umum.....	8
1.3.2 Tujuan khusus.....	8
1.4 Manfaat Penelitian	9

1.4.1	Akademik.....	9
1.4.2	Praktis.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA		10
2.1	Anatomi dan Histologi	10
2.1.1	Anatomi dan histologi saraf optik	10
2.1.2	Anatomi dan histologi retina	12
2.2	Glaukoma	16
2.2.1	Epidemiologi	17
2.2.2	Klasifikasi glaukoma	18
2.2.3	Tekanan intra okuler.....	20
2.2.4	Penatalaksanaan glaukoma	25
2.3.	Apoptosis	31
2.3.1	Apoptosis sel ganglion retina akibat glaukoma	35
2.3.2	Peran Akt pada proses apoptosis	39
2.3.3	Peran VEGF pada proses apoptosis	43
2.3.4	Peran Hsp27 pada proses apoptosis.....	46
2.4	Sel Punca	48
2.4.1	Sel punca mesenkimal	52
2.4.2	Sel punca retina	55
2.5.	Pengaruh Oksigen Terhadap Sel Punca.....	57
2.5.1	Peran Hsp 27 pada hipoksia sel punca mesenkimal	61
2.5.2	Peran VEGF pada hipoksia sel punca mesenkimal	62
2.6.	Transplantasi Sel Punca Mesenkimal Prakondisi Hipoksia	64
2.6.1	Peran Hsp 27 pada transplantasi sel punca mesenkimal	64

2.6.2	Peran VEGF pada transplantasi sel punca mesenkimal	66
2.6.3	Peran TGF- β pada transplantasi sel punca mesenkimal	67
2.6.4	Peran Akt pada transplantasi sel punca mesenkimal	69
2.6.5	Tehnik transplantasi sel punca pada retina	71
2.7.	Model Hewan Glaukoma.....	72
2.8.	Identifikasi Sel	74
2.8.1	Identifikasi sel punca mesenkimal	74
2.8.2	Identifikasi sel ganglion retina	77
2.8.3	Identifikasi sel mikroglia	78
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	79
3.1	Kerangka Konseptual.....	79
3.2	Hipotesis Penelitian.....	82
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN	84
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	84
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Sampling Penelitian.....	88
4.2.1.	Populasi penelitian	88
4.2.2	Sampel penelitian	88
4.2.3	Besar sampel	89
4.2.3	Tehnik pengambilan sampel	90
4.3	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel	90
4.3.1	Variabel penelitian	90
4.3.2	Definisi operasional	92
4.4	Bahan dan Alat Penelitian	95
4.4.1	Hewan coba yang dikenai perlakuan.....	95

4.4.2	Sarana penelitian	97
4.5	Prosedur Pelaksanaan Penelitian	97
4.5.1	Kultur dan identifikasi sel punca mesenkimal sumsum tulang	97
4.5.2	Prakondisi hipoksia sel punca mesenkimal sumsum tulang	99
4.5.3	Pemeriksaan imunositokimia sel punca mesenkimal sumsum tulang	99
4.5.4	Induksi peningkatan TIO dan pengukuran TIO	100
4.5.5	Transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang prakondisi hipoksia	104
4.5.6	Pemeriksaan jaringan retina	105
4.5.7	Pemeriksaan imunohistokimia	105
4.5.8	Pemeriksaan derajat apoptosis	106
4.6	Cara Pengumpulan / Pengolahan dan Analisis Data	108
4.7	Tempat dan Waktu Penelitian	108
4.8	Kerangka Operasional	110
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS	111
5.1.	Eksplorasi dan Isolasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang.....	111
5.2.	Kultur Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang	115
5.2.1	Normoksia	117
5.2.2	Hipoksia	118
5.3	Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang.....	118
5.3.1	Identifikasi fenotip sel punca mesenkimal sumsum tulang	

	menggunakan pemeriksaan Imunositokimia	119
5.3.2	Identifikasi fenotip sel punca mesenkimal sumsum tulang menggunakan <i>flowcytometri</i>	121
5.4.	Hasil Pemeriksaan Ekspresi HIF-1 α , VEGF-A, VEGF-A 165b, Hsp-27 Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang	127
5.4.1	Ekspresi HIF-1 α	128
5.4.2	Ekspresi VEGF- A	128
5.4.3	Ekspresi VEGF-A 165b	129
5.4.4	Ekspresi Hsp27	131
5.5	Peningkatan Tekanan Intra Okuler pada Tikus Jenis <i>Sprague Dawley</i>	132
5.6	Transplantasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang Melalui Intravitreal	135
5.6.1	Labeling sel punca mesenkimal dengan PKH 26	136
5.6.2	Transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang melalui intravitreal	136
5.7	Pemeriksaan Sel Punca Mesenkimal Eksogenus dengan Labeling PKH26 pada Jaringan Retina	138
5.8	Pemeriksaan Ekspresi Protein pada Jaringan Retina dengan Imunohistokimia	140
BAB 6	PEMBAHASAN	160
6.1	Eksplorasi dan Kultur Sel Punca Mesenkimal Prakondisi Hipoksia 1%	160

6.2	Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang.....	163
6.3.	Ekspresi Protein HIF-1 α , VEGFA, VEGF-A 165b dan Hsp 27 Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang Pada Kultur Kondisi Normoksia dan Hipoksia 1%	165
6.4	Peningkatan Tekanan Intra Okuler pada Model Hewan Glaukoma	167
6.5	Transplantasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang Melalui Intravitreal dengan Labeling PKH 26	168
6.6.	Ekspresi Protein pada Jaringan Retina Pasca Transplantasi Sel Punca Mesenkimal	169
6.7	Penurunan Apoptosis dan Peningkatan Sel Ganglion Retina (Brn3b) Pada Lapisan Sel Ganglion Retina	185
6.8	Penemuan Baru	192
6.9	Keterbatasan Penelitian	196
6.9	Implikasi Hasil	197
BAB 7	PENUTUP	199
7.1	Kesimpulan	199
7.2	Saran	200
	DAFTAR KEPUSTAKAAN	201
	LAMPIRAN	216

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1.	Menunjukkan rata-rata ekspresi CD90 dan CD105 pada sel punca mesenkimal sumsum tulang hipoksia dan normoksia.	126
Tabel 5.2.	Menunjukkan signifikasi perbandingan kultur sel punca mesenkimal sumsum tulang normoksia dan hipoksia pada pemeriksaan imunositokimia CD90 dan 105 ($p < 0.05$	127
Tabel 5.3	Hasil uji statistik Multiple Comparation VEGF-A 165b	142
Tabel 5.4	Hasil uji statistik Multiple Comparation VEGFR2 - Brn3b	145
Tabel 5.5	Hasil uji statistik Multiple Comparation Hsp27	148
Tabel 5.6	Hasil uji statistik Multiple Comparation CD11b-TGF β 1	151
Tabel 5.7	Hasil uji statistik Multiple Comparation apoptosis	154
Tabel 5.8	Hasil uji statistik Multiple Comparation Brn3b	157

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Lapiran retina.....	13
Gambar 2.2	Anatomi dari Nervus Opticus	16
Gambar 2.3.	Progresifitas dari kerusakan saraf optik akibat glaukoma.....	17
Gambar 2.4.	Skema diagram keadaan normal (atas) dan glaukoma (bawah) dari papil nervus optik	22
Gambar 2.5	<i>Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis</i>	35
Gambar 2.6	Mekanisme apoptosis pada glaucomatous SGR akibat peningkatan TIO	39
Gambar 2.7	Signaling Akt	43
Gambar 2.8	VEGF signaling	45
Gambar 2.9	Peran Hsp pada proses anti-apoptosis.....	48
Gambar 2.10	Jenis dan sifat dari sel punca.....	49
Gambar 2.11.	Diferensiasi dari pluripoten sel punca	50
Gambar 2.12.	Diferensiasi sel punca mesenkimal	52
Gambar 2.13.	Induksi neurogenesis oleh sel punca mesenkimal	53
Gambar.2.14.	Mekanisme terapi yang potensial dari neurorestoration dengan menggunakan sel punca mesenkimal	55
Gambar 2.15	Sel punca dan progenitor retina beserta markernya.....	57
Gambar 2.16	Pengaruh kadar O ₂ terhadap neural sel punca dan interaksi dengan Notch dan BMP <i>signaling</i>	58
Gambar 2.17	Model hipotetis Ntn-1 berhubungan dengan efek anti-apoptosis.....	62

Gambar 2.18	Pengaruh hipoksia terhadap regulasi gen	63
Gambar 2.19	<i>Resolution-associated molecular patterns (RAMPs)</i> dalam respon inflamasi akut	65
Gambar 2.20	TGF- β superfamily signal transduction	69
Gambar 2.21	Peran Akt pada kelangsungan hidup sel	70
Gambar 2.22	Tehnik transplantasi sel punca atau sel progenitor ke retina	72
Gambar 2.23	Marker sel punca mesenkimal	76
Gambar 3.1	Kerangka konseptual	79
Gambar 4.1	Pengelompokan subyek penelitian invitro	85
Gambar 4.2	Pengelompokan subyek penelitian invivo	87
Gambar 4.3	Persiapan alat untuk peningkatan TIO	100
Gambar 4.4.	Persiapan alat untuk peningkatan TIO	101
Gambar 4.5.	Peningkatan TIO	102
Gambar 4.6	Pasca peningkatan TIO tikus masih terbius	104
Gambar 4.7	Kerangka operasional.....	110
Gambar 5.1	Proses eksplorasi sumsum tulang dari tulang femur dan tibia tikus <i>Sprague Dawley</i>	112
Gambar 5.2	Eksplorasi sel mononuklear sumsum tulang tikus	113
Gambar 5.3	Eksplorasi sel mononuklear sumsum tulang tikus	114
Gambar 5.4	Sel mononuklear hasil dari isolasi sumsum tulang tikus.....	115
Gambar 5.5	Kultur sel mononuklear	116
Gambar 5.6	Kultur sel punca mesenkimal sumsum tulang	116
Gambar 5.7.	Sel punca mesenkimal sumsum tulang yang dikultur pada	

	kondisi normoksia	117
Gambar 5.8	Sel punca mesenkimal sumsum tulang yang dikultur pada kondisi hipoksia	118
Gambar 5.9.	Imunositokimia CD 45	120
Gambar 5.10	Imunositokimia CD 105	120
Gambar 5.11	Hasil <i>flowcytometri</i> pada sel punca mesenkimal sumsum tulang pada kondisi normoksia CD34 dan CD45 dengan CD 90	122
Gambar 5.12	Hasil <i>flowcytometri</i> pada sel punca mesenkimal sumsum tulang CD34 dan CD45 dengan CD 105.....	122
Gambar 5.13	Hasil <i>flowcytometri</i> pada sel punca mesenkimal sumsum tulang kondisi normoksia CD34 dan CD45 dengan CD 44.....	123
Gambar 5.14	Hasil <i>flowcytometri</i> pada sel punca mesenkimal sumsum tulang kondisi hipoksia 1% CD34 dan CD45 dengan CD 90.....	124
Gambar 5.15	Hasil <i>flowcytometri</i> pada sel punca mesenkimal sumsum tulang kondisi hipoksia 1% CD34 dan CD45 dengan CD 105.....	125
Gambar 5.16	Hasil <i>flowcytometri</i> pada sel punca mesenkimal sumsum tulang kondisi hipoksia 1% CD34 dan CD45 dengan CD 44.....	125
Gambar 5.17	Hasil Pemeriksaan imunositokimia HIF-1 α	128
Gambar 5.18	Diagram Prosentase ekspresi VEGF-A pada kultur sel punca	

mesenkimal sumsum tulang normoksia dan hipoksia 1%	129
Gambar 5.19. Hasil Pemeriksaan imunositokimia VEGF-A	129
Gambar 5.20. Diagram Prosentase ekspresi VEGF-A 165b pada kultur sel punca mesenkimal sumsum tulang normoksia dan hipoksia 1%	130
Gambar 5.21. Hasil Pemeriksaan imunositokimia VEGF-A 165b	130
Gambar 5.22 Diagram prosentase ekspresi Hsp27 pada kultur sel punca mesenkimal sumsum tulang normoksia dan hipoksia 1%.....	131
Gambar 5.23 Hasil pemeriksaan imunositokimia Hsp27	131
Gambar 5.24 Keadaan mata sebelum peningkatan TIO	132
Gambar 5.25 Peningkatan TIO	133
Gambar 5.26 Pasca Peningkatan TIO	134
Gambar 2.27 Hasil fluoresensi sel punca mesenkimal sumsum tulang yang dilabel PKH 26	136
Gambar 5.28 Transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang allogen secara intravitreal	137
Gambar 5.29 Dilakukan enukleasi mata 4 minggu pasca transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang.....	138
Gambar 5.30 Hasil pemeriksaan jaringan retina pada kontrol	139
Gambar 5.31. Hasil pemeriksaan jaringan retina paska transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang kondisi normoksia	140
Gambar 5.32. Hasil pemeriksaan jaringan retina paska transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang kondisi hipoksia	140
Gambar 5.33. Gambaran sel yang mengkespresikan VEGF-A165b pada	

	lapisan sel ganglion retina	141
Gambar 5.34	Diagram jumlah sel yang mengekspresikan VEGFA-165b pada masing-masing kelompok	142
Gambar 5.35	Gambaran sel yang mengekspresikan VEGFR-2 dan Brn3b pada lapisan sel ganglion retina	144
Gambar 5.36	Diagram jumlah sel yang mengekspresikan VEGFR2-Brn3b pada masing-masing kelompok	145
Gambar 5.37	Gambaran sel yang mengekspresikan Hsp 27 pada lapisan sel ganglion retina	147
Gambar 5.38	Diagram jumlah sel yang mengekspresikan Hsp-27 pada masing-masing kelompok	148
Gambar 5.39	Gambaran sel yang mengekspresikan CD 11b dan TGF- β 1 pada lapisan sel ganglion retina	150
Gambar 5.40	Diagram jumlah sel yang mengekspresikan CD11b dan TGF β 1 pada masing-masing kelompok	151
Gambar 5.41	Gambaran sel yang mengalami apoptosis pada lapisan sel ganglion retina	153
Gambar 5.42	Diagram jumlah sel yang mengalami apoptosis pada masing-masing kelompok	154
Gambar 5.43	Gambaran sel ganglion retina pada lapisan sel ganglion retina	156
Gambar 5.44	Diagram jumlah sel yang mengekspresikan Brn3b pada masing-masing kelompok	157

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Analisis Statistik	216
Lampiran 2.	Hasil Pemeriksaan Flowcytometry	222
Lampiran 3.	Keterangan Kelaikan Etik	246
Lampiran 4.	Surat Pembelian Hewan Coba	247
Lampiran 5.	Data Sheet Reagen Penelitian	252



DAFTAR SINGKATAN

Akt	: <i>AKT8 virus oncogene cellular homolog</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
Bad	: <i>Bcl2 - associated agonist of cell death</i>
Bax	: <i>Bcl2 - associated x protein</i>
Bcl	: <i>B cell leukemia</i>
Bcl-xl	: <i>B-cell leukemia – extra large</i>
BSS	: <i>Balanced Salt Solution</i>
Ca ²⁺	: <i>Calcium</i>
Caspase	: <i>Cysteine proteases with aspartate specificity</i>
EPO	: <i>Erythropoietin</i>
EPOR	: <i>Erythropoietin receptor</i>
FADD	: <i>Fas associated death domain</i>
GON	: <i>Glaucomatous Optic Neuropathy</i>
HIF-1 α	: <i>Hypoxia inducible factor – 1 alfa</i>
HIF-1 β	: <i>Hypoxia inducible factor – 1 beta</i>
HRE	: <i>Hypoxia respons element</i>
HSP	: <i>Heat shock protein</i>
JNK	: <i>Jun N-terminal kinase</i>
NF- $\kappa\beta$: <i>Nuclear Factor – kappa β</i>
NMDA	: <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
P53	: <i>Tumor suppressor protein that protects from DNA damage</i>

PI3 kinase	: <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
SC	: Stem Cells
SGR	: Sel Ganglion Retina
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TIO	: Tekanan Intra Okuler
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor alfa</i>
TRADD	: <i>TNF receptor associated death domain</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	: <i>Vascular endothelial growth factor receptor – 2</i>
WHO	: <i>World health organization</i>

