

TESIS

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI CASPASE 3 DAN VEGF TERHADAP DENSITAS GANGLION DAN DENSITAS FOTORESEPTOR PADA LAPISAN RETINA TIKUS DIABETES

Corellation Between Caspase 3 and VEGF expression Towards Ganglion and Photoreceptor Density in Diabetic Rat Retina

Disusun dan diajukan oleh:
FADHLULLAH LATAMA
C025171003



PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022

TESIS

HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI CASPASE 3 DAN VEGF TERHADAP DENSITAS GANGLION DAN DENSITAS FOTORESEPTOR PADA LAPISAN RETINA TIKUS DIABETES

Correlation Between Caspase 3 and VEGF expression Towards Ganglion and Photoreceptor Density in Diabetic Rat Retina

Disusun dan diajukan oleh:
FADHLULLAH LATAMA
C025171003



PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022

**HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI CASPASE 3 DAN VEGF
TERHADAP DENSITAS GANGLION DAN DENSITAS
FOTORESEPTOR PADA LAPISAN RETINA TIKUS
DIABETES**

TESIS

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Spesialis-1 (Sp.1)

Program Studi

Ilmu Kesehatan Mata

Disusun dan diajukan oleh:

FADHLULLAH LATAMA

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (SP.1)
PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**Hubungan Antara Ekspresi Caspase 3 dan VEGF Terhadap
Densitas Ganglion dan Densitas Fotoreseptor Pada
Lapisan Retina Tikus Diabetes**

Disusun dan diajukan oleh

Fadhullah Latama

Nomor Pokok : C025 171 003

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Kesehatan Mata Fakultas
Kedokteran Universitas Hasanuddin

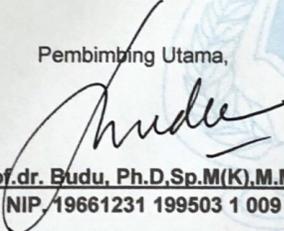
pada tanggal 22 April 2022

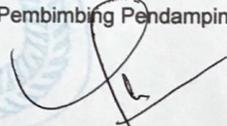
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.MedEd
NIP. 19661231 199503 1 009


dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA
NIP. 19740330 200501 2 002

Ketua Program Studi,

Dekan Fakultas Kedokteran,


dr. Muhs. Abbas Ismail, Sp.M(K), M.Kes
NIP. 198010192009 21002


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK
NIP. 19680530 199603 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Fadhlullah Latama
No. Stambuk : C 025 171 003
Program Studi : Ilmu Kesehatan Mata
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa Tesis dengan judul **HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI CASPASE 3 DAN VEGF TERHADAP DENSITAS GANGLION DAN DENSITAS FOTORESEPTOR PADA LAPISAN RETINA TIKUS DIABETES** adalah karya saya sendiri, dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari terbukti tesis karya saya ini Sebagian atau seluruhnya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Makassar, April 2022

Yang menyatakan,



Fadhlullah Latama

PRAKATA

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia Nya sehingga karya ini dapat diselesaikan dengan baik. Karya tulis berjudul **HUBUNGAN ANTARA EKSPRESI CASPASE 3 DAN VEGF TERHADAP DENSITAS GANGLION DAN DENSITAS FOTORESEPTOR PADA LAPISAN RETINA TIKUS DIABETES**, diajukan dan disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis dalam bidang Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Melalui kesempatan ini pula penulis dengan tulus dan rasa hormat menyampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Kepada Ibunda Dr. dr. Habibah S. Muhiddin, Sp.M(K), Dosen Bagian Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin sebagai guru, Ibu, sekaligus penguji karya akhir yang banyak memberikan bimbingan, dorongan dan dukungan secara moril dan materil terhadap penulis selama pendidikan ini dan dalam menyelesaikan penelitian.
2. Kepada Ayahanda Dr. Ir. Gunarto Latama, M.Sc atas setiap doa, kesabaran, serta dukungan yang tidak pernah putus kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan pendidikan ini.
3. Kepada Crisna Widya Silalahi dan Keenan Aljaffar Latama, istri dan anak yang memberikan dukungan hingga dapat menyelesaikan pendidikan.
4. Saudara-saudara saya, Fajrullah, Fathurrahman dan Atika Nabila yang memberikan dukungannya.
5. Rektor Universitas Hasanuddin, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Ketua Tim Koordinasi Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta didik di Program Pendidikan Dokter Spesialis Universitas Hasanuddin.
6. Dr. Andi Muhammad Ichsan, Ph.D, Sp.M(K), Ketua Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dan penguji

karya akhir-tesis saya yang selalu memberi bimbingan, semangat, serta nasehat selama penulis menjalani proses pendidikan.

7. Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed, Dosen Bagian Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Guru, dan pembimbing atas bimbingan dan masukan, serta kemudahan yang diberikan kepada penulis sejak awal hingga terselesaikannya karya ini.
8. dr.Upik A. Miskad,Ph.D, Sp.PA selaku pembimbing atas kesabaran dan bimbingan dalam hal penulisan karya akhir dan sekaligus mengajarkan ilmu dalam mengevaluasi ekspresi yang menjadi modalitas dalam karya akhir
9. Dr.dr.Andi Alfian Zainuddin,M.KM, selaku pembimbing statistik atas waktu dan segala bimbingan yang dicurahkan disela kesibukannya, sejak awal ide penulisan hingga terselesaikannya penyusunan karya akhir ini.
10. dr. Muhammad Abrar Ismail, Sp.M(K), M.Kes, selaku Ketua program Studi Ilmu Kesehatan Mata dan guru yang begitu banyak memberikan dukungan dan nasehat bagi penulis, juga segala bentuk pemikiran dan upaya demi memajukan kualitas pendidikan Dokter Spesialis Mata Universitas Hasanuddin.
11. Dr. dr. Yunita, Sp.M(K), sebagai guru, sekaligus pembimbing akademik, yang begitu banyak memberikan bantuan dan dukungan dari awal proses pendidikan hingga penyusunan karya akhir.
12. Seluruh Staf Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan juga kepada guru-guru kami, Prof. Dr. dr. Rukiah Syawal, Sp M(K), dr. Rahasiah Taufik, Sp.M(K), Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed, Dr.dr. Halimah Pagarra, Sp.M(K), dr. Suliati P. Amir, Sp.M, M.edEd, Dr. dr. Batari Todja, Sp.M(K), Dr. dr. Purnamanita Syawal, Sp.M, M.Kes, dr. Andi Tenrisanna Devi, Sp.M(K) M.Si, M.Kes, Dr. dr. Noor Syamsu, Sp.M(K), MARS, M.Kes, dr. Mulasnaeny, Sp.M, dr. Andi Senggeng Relle, Sp.M(K), MARS, Dr. dr. Marlyanti N. Akib, Sp.M(K), M.Kes, dr. Soraya Taufik, Sp.M, M.Kes, dr. Hasnah Eka, Sp.M(K) , dr. Ruslinah HTM, Sp.M, dr. Azhar Farid, Sp.M, M.Kes, dr. Ahmad Ashraf, Sp.M(K), MPH, dr. Adelina T. Poli, Sp.M, dr. Ririn Nislawaty, Sp.M, M.Kes., dr. Ratih Natasya, Sp.M, M.Kes, dr. Nursyamsi, Sp.M, M.Kes., dr. Andi Pratiwi, Sp.M, M.Kes, dr. Andi Akhmad Faisal, Sp.M, M.Kes, dr. Rani Yunita Patong, Sp.M, dr. Andi Suryanita Tadjuddin, SpM, dr. Idayani Panggalo, Sp.M, dr. Muh. Irfan Kamaruddin,

Sp.M, MARS dan dr. Dyah Ayu Windy, Sp.M atas segala bentuk bimbingan, nasehat, dan setiap kesempatan yang telah diberikan dalam proses pendidikan. Kiranya Allah SWT membalas semua kebaikan guru-guru kami dengan balasan yang terbaik. Semoga ilmu yang diajarkan dapat menjadi ilmu yang bermanfaat bagi semua.

13. Kepada teman angkatan : dr. Budhi Karoma,Sp.M, dr. Irma Noviana Iskandar, dr.Dewi Nugrahwati Putri dan dr.Irma Fita Sampe , terimakasih telah banyak membantu dan menyertai perjalanan ini, menjadi saudara dalam suka dan duka sejak awal menjalani Pendidikan dokter spesialis hingga saat ini.
14. Kepada dr. Itzar Chaidir Islam, sebagai teman yang banyak memberikan masukan dan sharing selama penulisan karya akhir, juga banyak mengajarkan berbagai hal mengenai histologi yang sangat membantu selama proses pembuatan karya akhir.
15. Kepada semua staf laboratorium eksperimen hewan fakultas kedokteran Unhas yang begitu banyak membantu dari awal hingga akhir proses penelitian.
16. Seluruh senior dan sahabat, serta teman sejawat peserta PPDS Bagian Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, yang telah selalu memberikan semangat, segala bentuk dukungan dan kerja samanya selama penulis menjalani pendidikan ini.
17. Terimakasih yang tak terhingga pula penulis sampaikan kepada seluruh Staff Administrasi Departemen Ilmu Kesehatan Mata yang selama ini begitu banyak membantu selama proses pendidikan berjalan serta dalam penyelesaian penelitian dan karya akhir ini, terkhusus kepada ibu Endang Sri wahyuningsih,SE, Nurul Puspita, Mutmainnah Burhanuddin, dan Sudirman yang selalu siap membantu.
18. Seluruh paramedis di RS Pendidikan UNHAS, RS Wahidin Sudirohusodo, Klinik mata ORBITA Makassar serta Rumah Sakit jejaring atas kerjasamanya selama penulis menjalani pendidikan.
19. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan karya akhir ini tidak lepas dari kekurangan dan kelemahan akibat keterbatasan kemampuan maupun pengetahuan penulis, Oleh karena itu penulis mengharapkan masukan sebagai perbaikan untuk karya ini. Kiranya Allah SWT dapat memberikan balasan yang terbaik untuk setiap doa, dukungan, dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama ini.

Makassar, April 2022

Fadhlullah Latama

ABSTRAK

Fadhlullah Latama. Hubungan Antara Caspase 3 dan VEGF terhadap Densitas Ganglion dan Densitas Fotoreseptor pada Lapisan Retina Tikus Diabetes (dibimbing oleh Prof.dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.MedEd, Dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA dan Dr.dr. Andi Alfian Zainuddin, M.KM)

Penelitian ini bertujuan untuk melihat hubungan antara Densitas ganglion dan Densitas fotoreseptor yang dikorelasikan dengan ekspresi Caspase 3 dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada retina hewan coba tikus diabetes dengan induksi menggunakan streptozotocin (STZ).

Penelitian dilakukan dengan mengobservasi 35 ekor tikus yang dibagi kedalam tujuh kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, dimana terdiri dari kelompok kontrol tanpa perlakuan, kelompok dengan induksi STZ yang dilakukan *sacrifice* pada satu minggu setelah induksi hingga kelompok enam minggu setelah induksi. Dari tiap subjek dilakukan enukleasi yang selanjutnya akan dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk mengevaluasi densitas fotoreseptor, densitas ganglion, ekspresi VEGF dan ekspresi caspase 3.

Dari penelitian yang telah dilakukan 35 subjek, didapatkan hasil pada 28 subjek. Melalui evaluasi terhadap retina dengan variable densitas ganglion, densitas fotoreseptor, ekspresi VEGF dan caspase 3 melalui histokimia pada lapisan ganglion dan fotoreseptor, didapatkan penurunan Densitas fotoreseptor yang signifikan menurun seiring dengan lama durasi diabetes.(549.20 vs 383.33 vs 389.00 vs 443.50 vs 506.50 vs 393.00, $p < 0.039$). Perubahan densitas ganglion ditemukan tidak signifikan $p < 0.112$. Perbandingan ekspresi caspase 3 ganglion dan fotoreseptor secara berurut $p < 0.001$ dan $p < 0.001$. Perbandingan ekspresi VEGF pada ganglion dan fotoreseptor secara berurut $p < 0.001$ dan $p < 0.001$.

Korelasi antara VEGF dan caspase 3 pada lapisan ganglion dan fotoreseptor ditemukan tidak signifikan, dengan $p < 0.400$ dan $p < 0.400$.

Penurunan densitas fotoreseptor diobservasi dari kondisi tikus tanpa diabetes hingga kelompok tikus diabetes dengan masa observasi yang lebih lama. Didapatkan peningkatan dari VEGF dan Caspase 3 pada lapisan ganglion dan fotoreseptor dari kondisi tanpa diabetes hingga kelompok dengan minggu observasi yang lebih lama. Perubahan densitas ganglion ditemukan tidak signifikan. Tidak ada korelasi antara ekspresi VEGF dan caspase 3 pada ganglion dan fotoreseptor tikus diabetik.

Kata kunci : Tikus Diabetes, Densitas Ganglion, Densitas Fotoreseptor, immunohistokimia, Vascular Endothelial Growth Factor , Caspase 3.

ABSTRACT

Fadhlullah Latama. Hubungan Antara Caspase 3 dan VEGF terhadap Densitas Ganglion dan Densitas Fotoreseptor pada Lapisan Retina Tikus Diabetes (dibimbing oleh Prof.dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.MedEd, Dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA dan Dr.dr. Andi Alfian Zainuddin, M.KM)

Purpose: To determine the correlation between ganglion density and photoreceptor density towards Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression and Caspase 3 expression in diabetic rat model which induced with streptozotocin (STZ).

Method : Animal experiment, 35 subjects which divided into seven groups. 1 control group and 6 STZ induced diabetic group that had been sacrificed each week, from the first week after being induced until sixth weeks. Every subject had been enucleated and the retina underwent immunohistochemistry examination to determine the ganglion density, photoreceptor density, caspase 3 expression and VEGF expression.

Result : After performing all the procedure, we obtained 28 subjects from the total 35 subjects. Photoreceptor and Ganglion density was observed. Caspase 3 and VEGF expression was evaluated. Significant decreasing of photoreceptor density (.549.20 vs 383.33 vs 389.00 vs 443.50 vs 506.50 vs 393.00, $p < 0.039$). Ganglion density wasn't significant $p < 0.112$. Expression comparison between caspase 3 ganglion and caspase 3 photoreceptor consecutively $p < 0.001$ and $p < 0.001$. Expression comparison between

VEGF ganglion and VEGF photoreceptor consecutively $p < 0.001$ and $p < 0.001$. There was no correlation between VEGF and caspase 3 in ganglion and photoreceptor consecutively $p < 0.400$ and $p < 0.400$.

Conclusion : Decreasing of photoreceptor density could be observed among control and diabetic rat from the group of the first week until the longer observation group. Increasing of VEGF and caspase 3 among ganglion and photoreceptor could be observed among control and diabetic rat from the group of the first week until the longer observation group. There was no significant decreasing of ganglion cell layer in diabetic rat. There was no correlation between VEGF and caspase 3 in diabetic rat.

Key words : Diabetic Rat, Ganglion Density, Photoreceptor Density, Immunohistochemistry, Vascular Endothelial Growth Factor, Caspase 3.

DAFTAR ISI

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Hipotesis Penelitian	5
E. Manfaat Penelitian	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Diabetic Retinopati	6
B. Proses Apoptosis	7
C. Caspase 3 sebagai eksekutor apoptosis	9
D. VEGF pada kondisi diabetes	10
E. Eksperimen hewan diabetes	13
F. Kerangka Teori	15
G. Kerangka konsep	15
H. Alur penelitian	16

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian	17
B. Tempat dan waktu penelitian	17
C. Sampel penelitian	17
D. Kriteria inklusi dan eksklusi	17
E. Prosedur kerja	17
F. Izin penelitian dan kelayakan etik	20
G. Definisi operasional dan kriteria objektif	20
H. Identifikasi Variabel	22
I. Sarana penelitian	22
J. Prosedur penelitian	22
K. Pengolahan dan analisis data	23
	23

BAB IV HASIL PENELITIAN	25
BAB V PEMBAHASAN	31
A. Deskripsi Umum Subjek Penelitian	31
B. Perbedaan Densitas Ganglion dan Fotoreseptor pada Kelompok Kontrol dan Diabetes	31
C. Perbandingan Ekspresi Caspase 3 pada Ganglion dan Fotoreseptor pada Kelompok Kontrol dan Diabetik	33
D. Perbandingan Ekspresi VEGF pada Sel Ganglion dan Sel Fotoreseptor pada Kelompok Kontrol dan Diabetik	35
E. Korelasi antara Ekspresi Caspase 3 dan VEGF terhadap Densitas Sel Ganglion dan Fotoreseptor	37
BAB VI PENUTUP	39
A. Kesimpulan	39
B. Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	47

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Pada kondisi Diabetes Melitus, hyperglycemia terjadi pada berbagai jaringan yang dimana akan memicu terjadinya komplikasi pada DM melalui terbentuknya reactive oxygen species (ROS), stress oksidatif dan berakibat pada kematian sel. Retinopati diabetik adalah salah satu komplikasi kronis diabetes mellitus , merupakan salah satu penyebab gangguan kebutaan, termasuk pada usia produktif. Sejak lama kelainan mikrovaskuler dinyatakan merupakan penyebab utama kerusakan pada retina.^{1,2}

Pada studi berbasis populasi yang dipublikasi pada tahun 2004, dilaporkan proporsi RD berkisar 4,8% secara global, merupakan peringkat kelima penyebab kebutaan di dunia. Di Amerika Utara dan Australia kebutaan RD mencapai 17% populasi, 15-17% di Eropa dan dinegara dimana katarak, glaukoma, dan kekeruhan kornea masih merupakan penyebab utama kebutaan, kebutaan karena RD berkisar 3-7%.² Sebuah meta-analisis berdasarkan studi berbasis populasi yang dilakukan di seluruh dunia dari tahun 1990 hingga 2010 memperkirakan bahwa 833.690 orang mengalami kebutaan dan 3,7 juta mengalami kebutaan secara global pada 2010 karena RD. Angka tertinggi dari pasien diabetes yang mengalami kebutaan didapatkan di Asia Selatan dengan angka 295.000; Afrika Utara / Timur Tengah, sebanyak 108.000; Afrika sub-Sahara Timur sebanyak 50.000; dan Afrika sub-Sahara Barat sebanyak 66.000. Sedang dan berat gangguan penglihatan karena RD memengaruhi 3174 juta, dan jumlah terbesar mereka berada di Asia Selatan, 1450 juta, diikuti oleh Afrika Utara / Timur Tengah, 336.000; Asia Timur, 279.000; Eropa Barat, 225.000; Sub-Sahara Barat Afrika, 193.000; Eropa Timur, 166.000; Afrika sub-Sahara Timur, 128.000; dan Amerika Latin Tengah, 109.000. Prevalensi kebutaan sedang dan berat karena RD pada rentang usia diatas 50 tahun adalah 1,9% secara global dan tertinggi sebanyak 0,51% di Asia Selatan, 0,50% di Barat Afrika sub-Sahara, 0,44% di Afrika Utara / Timur Tengah, 0,36% di Amerika selatan, 0,33% di Afrika sub-Sahara Tengah, 0,32% di Amerika Latin, 0,31% di Afrika sub-Sahara Timur, dan 0,26% di Oceania.³

Vision threatening Diabetic Retinopathy (VTRD) adalah istilah yang digunakan untuk kondisi proliferaatif dengan tingkatan lebih dari 60 berdasarkan skala EDTRS atau edema makula dalam berbagai tahapannya, dan kondisi tersebut sangat penting untuk merencanakan manajemen dan tatalaksana jangka panjang pada pasien demi menghindari kondisi kebutaan. Prevalensi dan faktor risiko VTRD berdasarkan meta-analisis dari 38 studi berbasis populasi dari Australia, Amerika Serikat, Eropa, dan Asia melibatkan 42.091 peserta dari 20 hingga 79 tahun dengan diabetes. Tidak ada perbedaan jenis kelamin yang dapat dilihat dalam prevalensi VTRD yaitu 11,7%; dengan angka tertinggi pada populasi afrika amerika sebesar 16,89%; diikuti oleh kaukasia sebesar 15,45%; dan hispanik sebesar 10,35, dan terendah di Asia Selatan yaitu 5,2%. Durasi diabetes melitus (DM) dikaitkan dengan prevalensi kebutaan yang meningkat pesat, dari 3,53% untuk DM kurang dari 10 tahun, meningkat hingga 17,78% dalam periode 10-20 tahun dan mencapai 87% selama lebih dari 20 tahun.^{4,5}

RD telah lama dideskripsikan secara eksklusif sebagai penyakit mikrovaskuler pada mata. Terjadi disfungsi endotel akibat berbagai proses biokimia ditingkat endotel dan perisit yang menyebabkan reaksi inflamasi, apoptosis perisit, oklusi vaskuler dan pelepasan berbagai mediator inflamasi dan faktor angiogenik termasuk VEGF. Apoptosis adalah salah satu proses kematian sel. Karakteristik apoptosis al terjadi perubahan morfologi sel dimana prosesnya membutuhkan enzyme dan mediator tertentu. hasilnya hilangnya sel dengan kerusakan minimal pada jaringan sekitar. Berkurangnya growth factor, dan stress intraseluler dapat menginduksi apoptosis melalui *intrinsic cell death pathway*, sedangkan *extrinsic apoptosis* diinisiasi melalui kerusakan reseptor trans membrane. Kedua proses in diregulasi oleh kelompok protein BCL-2, kelompok caspase, khususnya caspase 3 dan caspase 7 sebagai eksekutor dari suatu proses apoptosis.⁶

Enzim Caspase 3 adalah anggota dari famili caspase, famili endoprotease, yang meregulasi inflamasi dan apoptosis. Caspase-3 dikenal sebagai caspase eksekutor pada apoptosis karena peranannya dalam mengkoordinasi destruksi struktur sel al fragmentasi DNA, degradasi protein sitoskeletal.^{6,7,8}

Vascular endothelial growth factor (VEGF) diketahui faktor faktor proliferasi endotel pembuluh darah, khususnya pada munculnya neovaskularisasi. Namun, Bukti-bukti terakhir menunjukkan peran VEGF sebagai neuroprotector dan neurotropik pada retina, namun proses seluler yang terjadi masih belum jelas. Diduga bahwa apabila terjadi apoptosis, maka Sel Ganglion Retina akan mengekspresikan VEGF untuk menghambat proses apoptosis tersebut.⁸

Dalam beberapa tahun terakhir, semakin berkembang pemahaman yang difokuskan pada degenerasi neuroretinal terhadap patogenesis penyakit. Beberapa studi mendukung teori bahwa pada fase awal RD sudah terjadi gangguan neuron retina yang memicu apoptosis sel retina terutama ganglion disertai meningkatnya mediator neuron protektor seperti VEGF yang justru memicu berkembangnya kelainan mikrovaskuler yang akan diikuti manifestasi klinik di retina. Mediator yang terlibat dalam hubungan antara neurodegenerasi dan perubahan vaskular belum diidentifikasi. Faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) bisa menjadi penghubung terpenting antara kematian neuron retina dan terjadinya lesi mikrovaskular. VEGF berperan penting sebagai neuroprotektif; Oleh karena itu pada fase awal dimana diduga sudah terjadi pengaruh hiperglikemi lama yang menimbulkan gangguan pada sel saraf termasuk di retina, terjadi peningkatan kadar VEGF untuk mencegah terjadinya apoptosis. Namun peningkatan VEGF dalam kurun waktu lama memicu perubahan vaskuler retina.⁹

Perubahan klinis yang ditunjukkan di pembuluh darah retina pada diabetes telah menyebabkan asumsi umum bahwa retinopati adalah semata-mata penyakit mikrovaskular. Namun demikian, diabetes juga dapat merusak sel-sel non-vaskular retina, menghasilkan perubahan fungsi dan hilangnya sel-sel ganglion, sel-sel horizontal, sel-sel amacrine dan fotoreseptor tanpa didahului kerusakan vaskuler. Dengan demikian retinopati diabetik tidak hanya disebabkan oleh gangguan mikrovaskuler, tetapi keadaan hiperglikemi dapat merusak sel saraf, termasuk sel saraf retina.¹⁰

Penurunan fungsi pada sel-sel retina dan degenerasi dari sel-sel tersebut diteliti lebih dalam melalui berbagai model penelitian. Dari sejumlah sel yang terdapat di retina, ganglion sel retina pada kondisi diabetes merupakan salah satu

yang pertama dievaluasi. Penelitian pada sel ganglion retina sudah dilakukan pada 1961 melalui pemeriksaan histologi dari sampel autopsi. Hingga saat ini berbagai model evaluasi terhadap ganglion sel dapat dilakukan mulai dari hitung ganglion sel retina pada sampel histologi, *retrograde dye*, hingga TUNEL. Berbagai studi menunjukkan proses apoptosis dengan hasil penurunan densitas ganglion sebagai tanda dari suatu degenerasi sel yang terjadi pada awal diabetes mellitus, bahkan sebelum memasuki kondisi diabetik retinopati.¹⁰

Pembuktian dari kondisi apoptosis yang terjadi pada retina telah mencapai tahap eksperimen pada hewan. Penelitian eksperimen dengan menggunakan model tikus dalam memahami proses apoptosis merupakan salah satu model penelitian yang dapat memaparkan hal tersebut secara komprehensif. Salah satu cara yang dapat digunakan yaitu dengan menggunakan streptozotocin yang diinjeksikan pada hewan coba. Injeksi dengan streptozotocin dapat mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas sehingga dapat berujung pada hiperglikemi. Dengan cara tersebut, dampak dari hiperglikemi pada tikus dapat dievaluasi, termasuk evaluasi terhadap proses apoptosis yang terjadi.^{11,12}

2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian yang dipaparkan pada latar belakang masalah, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah ada perbedaan densitas ganglion dan fotoreseptor retina pada tikus diabetik?
2. Apakah terjadi peningkatan ekspresi dari caspase 3 dan VEGF pada retina tikus diabetik?
3. Apakah terdapat korelasi antara ekspresi dari caspase 3 dan VEGF terhadap densitas sel ganglion dan fotoreseptor pada tikus diabetik.

3. Tujuan Penelitian

3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui ekspresi dari caspase 3 dan VEGF, dan pengaruhnya terhadap densities sel ganglion dan fotoreseptor pada model tikus diabetes.

3.2. Tujuan Khusus

1. Mengukur densitas sel ganglion dan sel fotoreseptor retina tikus diabetes dan kontrol.
2. Mengukur ekspresi caspase 3 dan VEGF pada retina tikus diabetes dan kontrol.
3. Melihat hubungan ekspresi caspase 3 dan VEGF dengan densitas sel ganglion dan fotoreseptor retina pada tikus diabetes dan kontrol.

1.4. Hipotesis penelitian

1. Terjadi peningkatan dari ekspresi caspase 3 pada retina tikus dengan diabetes.
2. Terjadi peningkatan ekspresi VEGF pada retina tikus diabetes.
3. Adanya pengaruh peningkatan ekspresi caspase 3 pada penipisan densitas ganglion dan fotoreseptor.
4. Adanya pengaruh peningkatan ekspresi VEGF pada penipisan densitas ganglion dan fotoreseptor.
5. Semakin lama progresifitas dari diabetes mellitus, makin meningkat ekspresi dari caspase 3 dan VEGF , seiring dengan penipisan dari densitas sel ganglion dan fotoreseptor.

1.5 . Manfaat Penelitian

1. Diharapkan penelitian dapat memberikan informasi mengenai ekspresi dari caspase 3 yang terjadi pada awal kondisi diabetik.
2. Diharapkan penelitian dapat memberikan informasi mengenai ekspresi dari VEGF yang terjadi pada awal kondisi diabetik.
3. Diharapkan penelitian dapat menunjukkan korelasi dari ekspresi VEGF dan caspase 3 terhadap densitas sel ganglion dan fotoreseptor.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

I. Diabetik Retinopati

Diabetik retinopati sejak abad ke 19 merupakan suatu komplikasi dari diabetes mellitus yang ditandai dengan mikroaneurism, eksudat yang progresif, perdarahan , dan pada akhirnya mengarah pada edema pada makula, *intraretinal microvascular abnormality*, dilatasi vena retina dan berujung pada tanda-tanda proliferasif yang signifikan pada retina. Gambaran klinik yang secara signifikan ditemukan pada masa fase *severe*. Hal tersebut melahirkan suatu protap penanganan yang terpusat pada fase *severe* ataupun lebih buruk sebagai suatu intervensi dalam mencegah kebutaan.^{13, 14, 15}

Beberapa dekade terakhir menunjukkan bahwa penurunan fungsi penglihatan terjadi sebelum munculnya fase *mild* hingga *moderate* dari diabetik retinopati. Gangguan penglihatan yang dapat muncul berupa gangguan sensitivitas kontras dan gangguan lapangan pandang yang mengakibatkan susahnya pasien pada kondisi tersebut untuk melakukan aktivitas seperti menyetir, membaca ataupun melakukan aktivitas sehari-hari. Hal tersebut memunculkan pertanyaan bahwa kerusakan pada retina akibat diabetik retinopati terjadi pada fase yang lebih awal.^{16,17,18}

Berbagai gangguan penglihatan pada fase awal diabetik retinopati melahirkan berbagai studi yang mencari lebih jauh awal dari kerusakan fungsi penglihatan akibat diabetik retinopati. Studi-studi tersebut mendapatkan hasil bahwa kerusakan sel retina pada diabetik retinopati diakibatkan oleh berbagai proses yang kompleks, mulai dari apoptosis yang diakibatkan oleh berbagai faktor intrinsik dan ekstrinsik, apoptonekrosis yang dimana kematian sel terprogram namun menyerupai suatu proses nekrosis dimediasi oleh *receptor interacting kinase* (RIP), kematian sel

karena proses *autophagic*, hingga *pyroptosis* yang merupakan suatu kondisi baru yang menunjukkan keratin sel yang dimediasi oleh kematian sel, dimana secara spesifik dependen terhadap caspase 1.^{19,20,21,22}

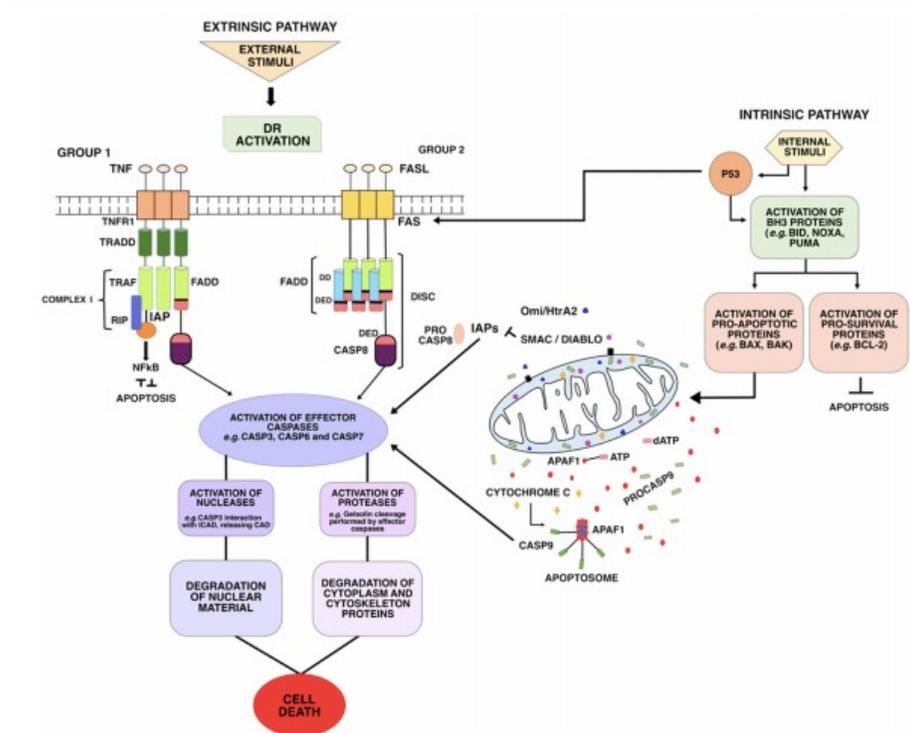
II. Proses Apoptosis

Apoptosis secara umum diketahui merupakan suatu proses kematian sel yang terprogram. Meskipun studi-studi yang telah dilakukan masih belum memahami proses dari apoptosis tersebut secara menyeluruh, namun studi-studi tersebut sedikit demi sedikit menjawab pertanyaan terhadap berbagai penyakit yang masih memiliki prevalensi tinggi secara global degeneratif, kanker, dan termasuk DM.^{23, 24}

Wyllie et al pada tahun 1993 telah memaparkan bahwa kematian sel akibat apoptosis membutuhkan sintesa protein yang diekspresikan oleh sel yang mengalami degenerasi dan dapat dicegah oleh faktor-faktor yang menghambat sintesa protein proapoptosis.⁹ Proses apoptosis sendiri dibagi menjadi 2 berdasarkan faktor pemicunya, yaitu *intrinsic pathway* dan *extrinsic pathway*. *Intrinsic pathway* atau yang biasa disebut juga dengan *mitochondrial pathway* merupakan faktor yang disebabkan stress yang berasal dari internal sel. Termasuk didalamnya kerusakan DNA akibat, retikulum endoplasma, yang dimana mengaktifkan BH3 protein. Apabila yang teraktivasi merupakan pro survival yang dimana salah satunya adalah BCL-2, BCL-X, maka proses apoptosis tidak terjadi. Sebaliknya apabila molekul pro apoptosis seperti BAX, BAK ikut teraktivasi maka proses tersebut akan mengaktifkan sel mengarah ke kondisi jalur caspase.^{25,26,27,28}

Extrinsic pathway juga menyebabkan apoptosis, yang dimana disebabkan oleh stimulus external sel. Mitokondria yang mengaktifkan jalur caspase belum tentu mengaktifkan kematian sel. Namun dengan bantuan *extrinsic pathway* dimana diaktifkan oleh *death receptor* yang dimana termasuk didalamnya adalah Fas, TNFR1. Oleh Ito et al dipaparkan bahwa

ikatan pada agonis antibodi atau Fas/ Fas Ligand alami, beberapa protein yang berikatan memicu apoptosis sel dan menginduksi apoptosis spesifik pada reseptor Fas intraseluler. Kelompok dari reseptor tersebut bisa pula diaktifkan oleh p53.^{29,30,31}



Gambar 1. Skema proses apoptosis dengan jalur intrinsik dan ekstrinsik yang mengarah pada jalur caspase atau *execution phase* yang berujung pada kematian sel.

Pada akhirnya *intrinsic pathway* dan *extrinsic pathway* akan mengarah pada *Execution phase* atau suatu fase yang mewaili jalus caspase. Caspase merupakan endoprotease yang bergantung pada residu sisten katalis yang bertujuan untuk menghidrolisasi dari ikatan peptida. Berbagai jalur caspase masih pada tahap studi dan pembagian kelompok caspase berdasarkan kemiripan dari karakter tiap jalur tersebut. Namun begitu, secara garis besar, proses apoptosis oleh jalur caspase mengaktifkan 2 proses, yaitu aktivasi nuklease yang merusak

nukleus sel, dan aktivasi protease yang merusak sitoplasma dan sitoskeleton yang keduanya merupakan struktur penyokong dari sel. Kedua jalur tersebut akan berujung pada kematian sel.^{32,33,34,35}

III. Caspase 3 sebagai eksekutor apoptosis

Pembuktian terbalik merupakan salah satu cara untuk mengetahui suatu efek oksidatif stress yang dapat menyebabkan apoptosis. Evaluasi terhadap subject yang melalui proses apoptosis yang dilakukan intervensi dengan antioksidan telah banyak dilakukan. Pada tahun 2012, Soufi et al menggunakan resveratrol, yaitu antioksidan yang banyak didapatkan dari nagger, pada studi dengan kelompok intervensi dan kontrol berupa tikus dengan diabetes dengan pemberian STZ dan evaluasi pada tikus normal. Dilakukan evaluasi 4 bulan terhadap Nuclear Factor-KB dimana merupakan molekul pro apoptosis yang meningkat tinggi pada tikus diabetes tanpa intervensi antioksidan, yang dimana diikuti oleh peningkatan aktifitas apoptosis yang terjadi ditandai dengan penipisan retina yang signifikan. Kumar et al pada tahun 2013 menggunakan konsep studi yang sama dengan mengevaluasi pemberian hesperidin sebagai antioksidan dan dampaknya terhadap proses inflamasi dari stress oksidatif (TNF-A dan IL-1B) yang berujung pada apoptosis (caspase 3 dan aquaporin 4) yang dievaluasi selama 24 minggu. Hasil dari studi tersebut menunjukkan parameter oksidatif stress yang meningkat sebanyak 2 kali lipat pada kelompok kontrol dibandingkan kelompok dengan intervensi. Molekul pro apoptosis (caspase 3 dan aquaporin 4) juga meningkat secara signifikan pada kelompok tanpa intervensi. Ditahun yang sama, silva et al juga melakukan studi terhadap subjek tikus diabetes pada kelompok kontrol tanpa intervensi teh hijau dan epigallocatechin gallate, yang merupakan antioksidan yang paling aktif yang terdapat pada teh hijau, yang kemudian diberikan per oral dalam 12 minggu. Studi tersebut menunjukkan peningkatan oksidatif retinal markers dan pada sampel in vitro ditemukan kerusakan yang signifikan pada muller cell dan peningkatan pada glial fibrillary acidic protein

yang dimana ditemukan jauh lebih rendah pada kelompok subjek dengan intervensi antioksidan^{36,37,38,39,40}

IV. VEGF pada kondisi diabetes.

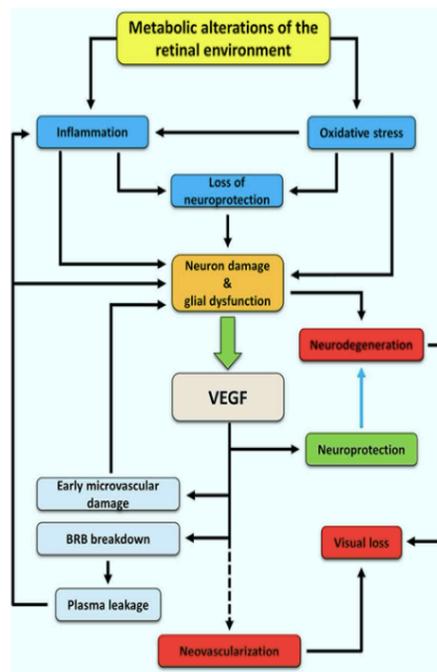
Telah lama diketahui bahwa VEGF merupakan angiogenik, namun fungsi utama VEGF yang lain adalah sebagai neuroprotektor. Meffert et al pada tahun 2002 melaporkan studi mengevaluasi efek dari VEGF pada hewan coba dan didapatkan angka VEGF yang tinggi pada lapisan retina khususnya pada ganglion sel selama proses pertumbuhan kembali dari retinal ganglion sel.^{41,42}

Berbagai terapi saat ini berdasarkan pada peningkatan VEGF dan berbagai cara untuk menekan jumlah VEGF. Namun Park et al pada tahun 2014 melakukan studi yang mengevaluasi dampak dari injeksi anti VEGF pada tikus diabetik dengan menggunakan metode imunohistokimia dan didapatkan bahwa retinal ganglion sel mengalami apoptosis yang signifikan selama proses inhibisi dari VEGF, dimana ditemukan hal yang bersifat novel bahwa sel amacrine juga mengalami apoptosis. Hal tersebut menunjukkan bahwa inhibisi dari VEGF dapat meningkatkan apoptosis pada lapisan retina dalam pada retina diabetes. Joachim et al pada tahun 2017 juga mengevaluasi kondisi jangka panjang dari pemberian terapi anti VEGF ranibizumab pada hewan coba dan ditemukan penurunan jumlah sel retinal ganglion yang signifikan pada kelompok dengan intervensi ranibizumab melalui metode imunohistokimia. Hal tersebut menunjukkan inhibisi masif dari VEGF dapat memicu apoptosis dari sel syaraf retina.^{43,44,45}

Hasil yang sama didapatkan oleh Shen et al pada tahun 2018 dengan suatu proses neurodegeneratif dimana dilakukan pada subjek hewan coba dengan kondisi *ocular hypertensive glaucoma* mengevaluasi pemberian VEGF yang dapat memberikan fungsi neuroprotektif. Diadapatkan hasil bahwa apoptosis ganglion cell terinhibisi secara signifikan dengan adanya VEGF.^{46,47}

Dari berbagai penelitian dipaparkan mengenai apoptosis, bahwa apoptosis terjadinya bahkan sebelum terjadinya gangguan vaskuler. Rossino et al memaparkan dengan menunjukkan suatu hipotesis kondisi yang terjadi di retina

selama diabetes dan mengarah ke RD. Hiperglikemia menginduksi perubahan metabolik di retina, yang dipicu oleh stres oksidatif dan memicu inflamasi. Proses oksidatif dan inflamasi menyebabkan kerusakan pada sel-sel neuron dan glial baik secara langsung maupun tidak langsung dengan menginduksi perubahan dalam produksi dan pelepasan faktor neurotrofik. Akibatnya, proses neurodegenerative teraktivasi. Sebagai upaya proteksi, neuron yang mengalami neurodegeneratif akan memicu produksi dan pelepasan VEGF, terutama oleh sel Muller, yang dapat bertindak sebagai neuroprotektor, sehingga menangkal neurodegenerasi. Namun, jika pada fase awal RD VEGF dapat bertindak sebagai faktor neuroprotektor, pelepasannya yang berkepanjangan memicu kerusakan vaskular dan pada akhirnya dapat memperberat inflamasi dan mengakibatkan kerusakan pada retina oleh karena proliferasi pembuluh darah baru. Jika tidak ditangani dengan baik, proses neurodegeneratif dan neovaskular berujung pada gangguan visual, yang pada akhirnya menyebabkan kebutaan.^{48,49,50}



Gambar 2. Skema dari kondisi apoptosis yang dimana lebih dulu terjadi akibat stres oksidatif dan inflamasi, mendahului fase pelepasan VEGF yang bersifat neuroprotektif sekaligus neoangiogenesis.³¹

Kurihara et al dalam studinya dapat menunjukkan bahwa kondisi yang merusak disebabkan oleh VEGFA dalam sel epitel berpigmen (RPE) pada retina tikus, yang mengatur homeostasis retina, dengan cepat menyebabkan hilangnya penglihatan dan ablasi choriocapillaris, suplai darah utama untuk retina luar dan sel fotoreseptor. Penghapusan VEGFA ini juga menyebabkan disfungsi cepat sel kerucut fotoreseptor, sel-sel yang bertanggung jawab untuk ketajaman visual dan penglihatan warna. Selanjutnya, penghapusan Vegfa menunjukkan penurunan regulasi yang signifikan dari beberapa gen angiogenik di kedua keadaan fisiologis dan patologis, sedangkan penghapusan faktor transkripsional regulasi hulu tidak mempengaruhi fisiologis ekspresi gen angiogenik. Hasil ini menunjukkan bahwa VEGF endogen memberikan dukungan trofik kritis diperlukan untuk fungsi retina. Faktor-faktor penargetan di hulu VEGF, seperti HIF, mungkin bersifat terapi menguntungkan dibandingkan dengan antagonis VEGF yang lebih kuat.^{51,52}

Berbagai teori yang berkembang mengenai VEGF juga terkait dengan fungsi VEGF sebagai anti neurotoxic dan atau berkontribusi terhadap neurotropik. Kerusakan-kerusakan yang terjadi pada kondisi neurodegeneratif dapat terhambat dengan fungsi VEGF, yang dimana ditemukan korelasinya terhadap ameloyd beta protein. Meskipun begitu, dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai proses keterikatan tersebut.^{53,54}

Studi oleh Sanchez et al menunjukkan bahwa VEGF juga erat fungsinya pada proses apoptosis, yaitu sebagai proteksi terhadap berbagai agen pro apoptosis. Pada kondisi caspase 3 yang meningkat, VEGF mampu memicu terbentuknya protein Bcl-2 yang signifikan, dimana protein tersebut dapat mesupresi fungsi pro apoptosis dari caspase-3. Fungsi yang serupa ditunjukkan oleh VEGF terhadap p38MAP kinase dimana VEGF dapat menaikan jumlah p38MAP kinase yang berperan erat pada ATF-2 phosphorylation yang memicu apoptosis sel pada saat terjadi stress pada sel,

salah satunya merupakan stress oksidatif. ^{53,54,55}

V. Eksperimen hewan diabetes

Model hewan coba selama bertahun-tahun telah memberikan sumbangsih dalam penelitian. Model penelitian dengan model hewan dapat memberikan pemahaman lebih mendalam terhadap suatu proses patogenesis. Model hewan yang dipilih dalam penelitian merupakan model yang melalui proses, khususnya proses patogenesis yang serupa dengan manusia. ⁵⁶

Dalam studi yang mempelajari proses dari diabetes dan bagaimana kerusakan akibat peningkatan hiperglikemi terjadi, berbagai jenis sampel mencit diabetes bisa digunakan. Model hewan coba, khususnya pada tikus, dapat spontan atau dengan manipulasi genetik dapat mengalami diabetes, contohnya jenis tikus zucker, tikus spontaneously diabetic torii dan tikus koto kakizaki. Sedangkan model tikus diabetes dengan induksi dapat dengan menggunakan model streptozotosin, model nikotinamid streptozotosin, model diet lemak - streptozotosin dan model diet tinggi lemak. ^{56,57}

Pemakaian studi eksperimental dengan model tikus yang diinduksi dengan streptozotosin banyak digunakan, dengan berbagai model intervensi yang bervariasi. Sampel tikus yang akan diinjeksikan bervariasi antara 200-400gr. Sampel tersebut harus melalui evaluasi ketat selama kontrol dalam pemberian streptozotosin. Streptozocin diinjeksikan secara intraperitoneal dengan dosis 45mg/kg BB dengan kondisi hiperglicemia tercepat dapat mencapai 3 hari pasca penyuntikan. Evaluasi gula darah dari tikus sendiri dapat berpegang pada rentang nilai normal 75-150mg/dl, diabetik ringan 150-200mg/dl dan 200-400mg/dl sebagai diabetik berat. ^{56,57}

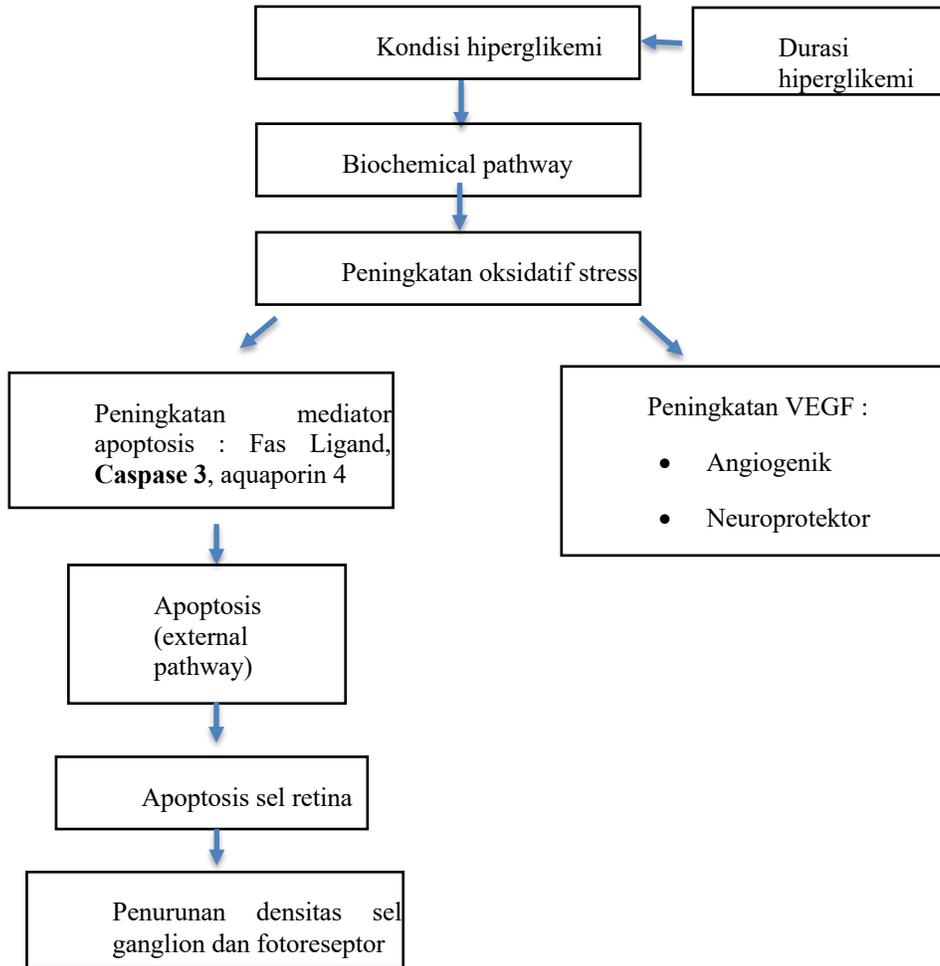
Berdasarkan model tersebut, dapat dievaluasi kerusakan-kerusakan dalam tingkat selular yang terjadi pada kondisi diabetes, khususnya pada awal diabetes. Pada studi dengan menggunakan model tikus dapat

dievaluasi kondisi apoptosis yang terjadi dari awal terjadinya diabetes. Tingginya jumlah komplikasi kardiovaskular yang terjadi akibat diabetes menstimulasi dibuatnya penelitian dengan mengevaluasi myocardium dari tikus dengan model diabetes melalui jalur caspase 3. Ditemukan bahwa proses apoptosis yang dimediasi oleh caspase 3 mengalami peningkatan yang tinggi melalui evaluasi imunohistokimia. Tidak hanya itu, jumlah stress oksidatif yang dapat dievaluasi meningkat jumlahnya pada daerah sel yang terjadi apoptosis.^{52, 53, 55}

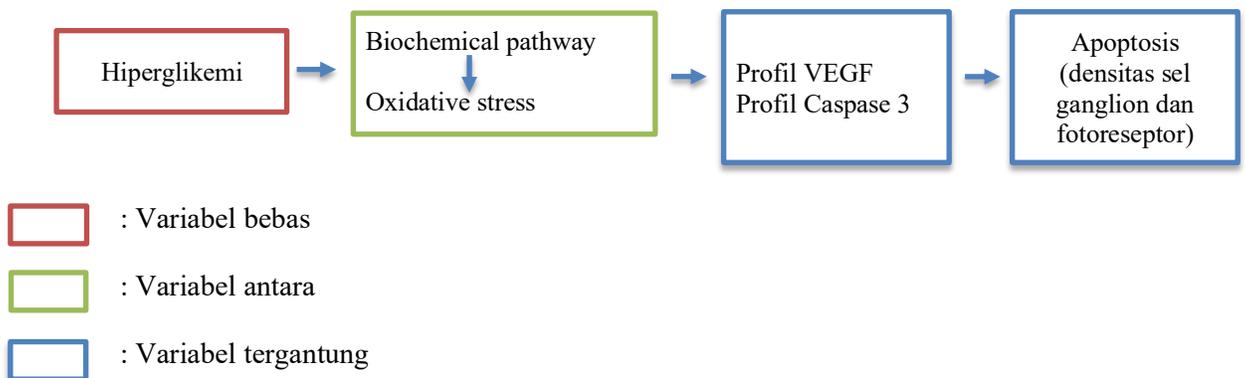
Dengan menggunakan imunohistokimia ditemukan bahwa caspase 3 ditemukan pada sel neuron sensori yang dievaluasi dari axon dan ganglion. Tidak hanya itu, evaluasi yang dilakukan terhadap sel neuron sensori juga menunjukkan sejumlah sel yang mengecil dan jumlah sel yang berkurang. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel neuron sensori sangat rentan terhadap kondisi stres oksidatif tinggi yang diakibatkan oleh kondisi diabetes.^{55,56}

Apoptosis yang dievaluasi melalui model tikus diabetes tidak hanya pada neuron sensori diperifer. Studi yang dilakukan dengan mengevaluasi tikus yang diinduksi STZ, dimana pada hari ketiga gula darah dari tikus mencapai 250mg/dl menunjukkan apoptosis yang terjadi pada neuron perifer. Apoptosis yang dievaluasi melalui hipocampus dari tikus diabetes dengan metode STZ menunjukkan peningkatan dari aktifitas caspase 3 dengan jumlah caspase pada jaringan hipocampus yang dievaluasi mencapai 6.9 kali lipat lebih tinggi daripada group tikus non diabetik. Berdasarkan paparan tersebut, sangat memungkinkan untuk dilakukan evaluasi terhadap tikus diabetes dalam mengetahui lebih jauh kondisi dari apoptosis yang terjadi pada sel retina yang dimana menjadi salah satu target yang paling rentan terhadap kerusakan akibat stres oksidatif dari kondisi diabetes.⁵⁸

II. KERANGKA TEORI



III. KERANGKA KONSEP



IV. ALUR PENELITIAN

