

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Glaukoma merupakan salah satu penyebab kebutaan permanen yang menyebabkan sekitar 6,6% dari seluruh kasus kebutaan di tahun 2010 (Bourne R.R. et al, 2010). Menurut *World Health Organization (WHO)*, sekitar 2,2 miliar gangguan penglihatan terjadi diseluruh dunia dan glaukoma menyumbang sekitar 6,9 juta kasus diantaranya (World Health Organization, 2019). Pada tahun 2040, diperkirakan sekitar 111,8 juta penduduk diseluruh dunia yang berusia antara 40 hingga 80 tahun akan mengalami glaukoma (Tham, Y. C. et al, 2014). Glaukoma secara umum disebabkan oleh karena peningkatan *Tekanan Intra Okular (TIO)* > 21 mmHg akibat gangguan drainase *Humor Aquos (HA)* (Bajwa M. N. et al, 2019). Peningkatan TIO yang progresif akan merusak dan mengakibatkan kematian RGC dan nervus optik sehingga menyebabkan adanya defek lapang pandang perifer yang diikuti dengan defek lapang pandang sentral secara bertahap (Tharmathurai S. et al, 2021). Beberapa studi menunjukkan bahwa kematian RGC dapat disebabkan adanya mekanisme apoptosis dimana terjadi kematian sel yang membutuhkan aktivasi sejumlah jalur intraseluler (Tham, Y. C. et al, 2014).

Glaukoma adalah kelompok kelainan optik neuropati yang ditandai dengan adanya perubahan pada diskus optikus dan kematian progresif dari *Retinal Ganglion Cell (RGC)* (Quigley, 2011). Proses neurodegeneratif seringkali meluas sepanjang aksis visual sehingga melibatkan korpus genikulatum lateral dan korteks visual (Nucci et al, 2015). Kematian RGC terjadi melalui proses apoptosis yang dapat terjadi melalui mekanisme inflamasi, stress oksidatif, disfungsi mitokondria, eksitotoksisitas glutamat, protein misfolding, serta iskemik dan hipoksia (Kaur C. et al, 2008). Masing-masing mekanisme tersebut dapat berkontribusi terhadap etiologi dan perkembangan glaukoma sehingga menjadi target dalam pendekatan terapeutic terbaru yang bersifat neuroprotektif (Adornetto A. et al, 2019). Ketidakseimbangan antara *Reactive Oxygen Species (ROS)* atau *Reactive Nitrogen Species (RNS)* dan

pertahanan antioksidan akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif sehingga memicu inflamasi kronis dan merusak kelangsungan hidup neuron (Sacca S. C. et al, 2018).

Pasien glaukoma membutuhkan tatalaksana seumur hidup untuk menghambat progresifitas penyakit serta mengurangi dampak negatif yang cukup signifikan terhadap kualitas hidup pasien (Choplin, N. T. et al, 2014). Prinsip tatalaksana glaukoma adalah mencapai target TIO baik dengan terapi farmakologis maupun intervensi bedah. Namun, pada beberapa kasus glaukoma tetap mengalami progresifitas dan mempengaruhi fungsi visual meskipun TIO telah mencapai target seperti halnya pada pasien dengan *Normo Tension Glaucoma (NTG)*. Melihat kondisi tersebut, muncul pendekatan terapi alternatif atau adjuvan pada glaukoma sebagai neuroprotektor guna menghambat progresifitas penyakit (Lusthaus J. et al, 2019 dan European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 2017). Di Kanada, dilakukan survey pada 1.516 pasien glaukoma dimana 10% diantaranya menggunakan produk alami sebagai terapi alternatif dan dipercaya memberikan manfaat (Wan M. J. et al, 2012). Hasil survey lainnya menunjukkan prevalensi penggunaan terapi alternatif dengan produk alami di Arab Saudi dan Palestina sebesar 22% dan 67% (Al Salman S. et al, 2021 dan Jaber D. et al, 2021).

Neuroprotektor merupakan terapi adjuvan yang biasa diberikan pada pasien glaukoma guna menghentikan atau menghambat degenerasi serta kematian RGC (Weinreb R. N. et al, 2016). Terapi ini merupakan inovasi baru dan berkembang cukup pesat terutama untuk terapi adjuvan pada kasus glaukoma yang mengalami progresifitas meskipun telah diberikan terapi secara optimal (Quigley, 2011). Melihat hal ini, dokter spesialis mata harus mulai memberikan edukasi pada pasien glaukoma mengenai pengobatan, keamanan, dan kemanjuran terapi ini. Faktanya, penggunaan produk alami sebagai neuroprotektor seperti herbal, vitamin, dan mineral pada glaukoma telah digunakan oleh 52% populasi umum (Tharmathurai S. et al, 2021 dan Wan M. J. et al, 2012). Meskipun terapi ini banyak mengandung senyawa aktif biologis, hanya sedikit tanaman yang telah dianalisa dan dievaluasi secara fitokimia terkait

potensi terapinya (Jaber D. et al, 2021 dan Wright C. et al 2016).

Saat ini kandungan senyawa aktif dari tanaman potensial terus diekstraksi guna mencukupi kebutuhan terapi adjuvan pada kelainan mata. Di Amerika Serikat, *Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM)* menerapkan prosedur dan kontrol yang sama dalam peresepan obat-obatan, namun hal ini tidak berlaku untuk herbal dan suplemen makanan (European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 2017). Mengingat bahwa glaukoma dapat menyebabkan degenerasi dan kematian RGC, neuroprotektor mendapat perhatian lebih sebagai strategi baru guna menghambat progresifitas baik secara morfologi maupun fungsional. Beberapa diantaranya yang dipercaya memiliki efek neuroprotektor adalah *Ekstrak Ginkgo Biloba (EGB)* dan *Ekstrak Buah Merah (EBM)*.

Stress oksidatif dan gangguan sirkulasi mikrovaskular diketahui berhubungan dengan glaukoma dan terdapat bukti adanya keterlibatan keduanya dalam patogenesis degenerasi optik glaukomatosa. EGB (*Ginkgo Biloba Linnaeus*) menunjukkan mampu melindungi RGC dari kejadian hipoksia baik secara in vitro maupun in vivo. Cho et al melaporkan bahwa EGB berpotensi mengurangi cedera iskemia/reperfusi dan berpengaruh positif terhadap stress oksidatif serta sirkulasi vaskular yang terganggu dengan menghambat ROS dan menekan mediator proinflamasi *Nitric Oxide (NO)* serta sitokin proinflamasi *Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)*, *Interleukin-6 (IL-6)*, *Interleukin-1 β (IL-1 β)* melalui jalur signal *Nuclear Factor-kappa B (NF-kB)* pada model hewan NTG (Cho H. K. et al, 2019).

Buah merah (*Pandanus Conoideus Lamk.*) dilaporkan memiliki aktifitas neuroprotektor, hal ini sejalan dengan studi yang dilakukan oleh Susan et al pada hewan coba tikus model diabetik yang diberikan EBM selama 14 hari menunjukkan adanya efek perlindungan pada sel fotoreseptor dan RGC dibandingkan dengan kelompok kontrol (Susan et al, 2024). Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan uji pemanfaatan EGB dan EBM yang diujikan pada organ mata kelinci model NTG yang diduga mampu memberikan efek protektif antioksidan sekaligus meningkatkan sirkulasi mikrovaskular. Hasil penelitian ini diharapkan

dapat menjadi dasar untuk menelusuri efek pemberian EGB dan EBM terhadap densitas RGC pada kasus NTG.

1.2. Rumusan Masalah

- a. Bagaimana efek EGB dan EBM terhadap densitas RGC pada kelinci model NTG berdasarkan pemeriksaan histopatologi?
- b. Apakah ada perbedaan efektifitas pemberian terapi secara kombinasi dengan tanpa kombinasi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek EGB dan EBM terhadap densitas RGC pada kelinci model NTG.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui densitas RGC pada kelompok kelinci yang tidak diberikan terapi kemudian diinduksi NTG.
- b. Untuk mengetahui densitas RGC pada kelompok kelinci yang diberikan kombinasi EGB dan EBM kemudian diinduksi NTG.
- c. Untuk mengetahui densitas RGC pada kelompok kelinci yang diberikan EGB kemudian diinduksi NTG.
- d. Untuk mengetahui densitas RGC pada kelompok kelinci yang diberikan EBM kemudian diinduksi NTG.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Keilmuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dalam pengembangan riset mengenai pemanfaatan EGB dan EBM terhadap perlindungan RGC pada kelinci model NTG.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran tentang efek EGB dengan EBM terhadap perlindungan RGC pada kelinci model NTG.

1.5. Hipotesis

- a. EGB dengan EBM memberikan efek proteksi RGC pada kelinci model NTG.
- b. Kombinasi EGB dengan EBM memberikan efek proteksi RGC lebih baik dibandingkan tanpa kombinasi pada kelinci model glaukoma.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Glaukoma

Glaukoma mengacu pada suatu kelompok neuropati optik progresif yang dikarakteristikan dengan gambaran ekskavasio diskus optik dan kehilangan RGC beserta aksonnya disertai hilangnya penglihatan. Lamina kribrosa menjadi lokasi primer yang mengalami kerusakan struktural pada mata dengan *Glaucomatous Optic Neuropathy (GON)* sehingga menyebabkan gambaran ekskavasio diskus optik. Penyebab terjadinya glaukoma bersifat multifaktorial mencakup faktor genetik dan lingkungan (Basic and Clinical Science Course Section 1, 2023-2024).



Gambar 2.1. Gambaran diskus optik yang menunjukkan ekskavasio diskus optik atau “cupping”. Tampak hilangnya neural rim secara fokal (yang ditunjuk panah) dan pori-pori laminar yang terlihat pada area superior.

TIO merupakan salah satu faktor risiko progresifitas pada glaukoma, tekanan tidak meningkat diatas rentang normal pada sebagian besar pasien dengan *Primary Open Angle Glaucoma (POAG)* sehingga dikategorikan sebagai NTG. *Ocular Hypertension (OHT)* didefinisikan sebagai kondisi dengan peningkatan TIO tanpa disertai gangguan lapang pandang dan diskus optik, sehingga Sebagian besar pasien dengan OHT jarang berkembang menjadi glaukoma. Pada pasien glaukoma, TIO awal dianggap terlalu tinggi sehingga mengganggu fungsi dan kelangsungan hidup RGC. Pada sebagian besar kasus glaukoma, menurunkan TIO akan menghambat progresifitas kehilangan lapang pandang.

Tabel 2.1. Klasifikasi Glaukoma dan Kondisi Terkait

<i>I. Open Angle</i>
<i>a. Primary Open Angle Glaucoma (POAG)</i>
• <i>Normo Tension Glaucoma (NTG)</i> • <i>Juvenile Open Angle Glaucoma (JOAG)</i>
<i>b. Secondary Open Angle Glaucoma (SOAG)</i>
• <i>Pseudoexfoliation syndrome</i> • <i>Pigmentary glaucoma</i> • <i>Traumatic glaucoma</i> • <i>Steroid induce glaucoma</i> • <i>Glaucoma associated with intraocular inflammation</i> • <i>Hemolytic glaucoma & Ghost cell glaucoma</i> • <i>Glaucoma associated with intraocular tumors</i> • <i>Glaucomatocyclitis crisis</i> • <i>Fuchs uveitis syndrome</i> • <i>Uveitis-glaucoma-hyphema syndrome</i> • <i>Lens Associated :</i> ○ <i>Glaucoma associated with elevated EVP</i> ○ <i>Glaucoma associated with siderosis</i> ○ <i>Schwartz syndrome</i> ○ <i>IOP elevation associated with anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) therapy</i>
<i>II.Angle Closure</i>
<i>a. Primary Angle Closure Glaucoma (PACG)</i>
<i>b. Secondary Angle Closure Glaucoma (PACG)</i>
• <i>With pupillary block</i> • <i>Lens-induced glaucoma</i> • <i>Aphakic pupillary block</i> • <i>Posterior synechiae</i> • <i>Without pupillary block</i> • <i>Anterior pulling mechanism</i> • <i>Posterior pushing mechanism</i>
<i>III. Combined-Mechanism Glaucoma</i>

Namun, pada beberapa kasus didapatkan kerusakan nervus optik tetap berlanjut meskipun target TIO telah tercapai (Basic and Clinical Science Course Section 1, 2023-2024). Sebagai salah satu penyebab kebutaan yang ireversibel di dunia, glaukoma menjadi masalah kesehatan publik yang signifikan. Pada tahun 2020, diperkirakan sekitar 80 juta penduduk diseluruh dunia akan mengalami glaukoma dengan potensi kebutaan secara bilateral sebanyak 11,2 juta. Sebuah studi meta-analisis melaporkan bahwa prevalensi global sekitar 3,5% terjadi pada usia 40-80 tahun. Hal ini disebabkan usia yang lebih tua merupakan faktor risiko mayor pada glaukoma dan terjadi hampir pada sebagian besar populasi dan

diperkirakan akan terjadi peningkatan yang signifikan pada dekade mendatang (Bourne RR et al, 2016 dan Tham YC et al, 2014).

Glaukoma pada orang dewasa diklasifikasikan sebagai glaukoma sudut terbuka atau tertutup dan glaukoma primer atau sekunder seperti yang terlihat pada tabel 1. Membedakan sudut terbuka dan tertutup menjadi hal yang penting untuk menentukan langkah terapi yang akan diambil (Basic and Clinical Science Course Section 1, 2023-2024).

Pada glaukoma sudut terbuka, pemeriksaan gonioskopi menunjukkan tidak ada sumbatan pada trabecular meshwork. Kondisi ini kemudian diklasifikasikan menjadi POAG bila tidak ada kelainan yang mendasari terjadinya peningkatan TIO, sedangkan dikatakan SOAG bila ditemukan adanya kelainan yang mendasari terjadinya glaukoma. Pada mata POAG dengan peningkatan TIO, sumbatan HA disebabkan adanya kelainan pada matriks ekstraseluler dari *Trabecular Meshwork (TM)* dan sel trabekular pada area juxtacanalicular atau kelainan fungsi sel endotel yang melapisi dinding dalam kanalis schlem. Istilah NTG sering digunakan pada mata dengan POAG tanpa disertai dengan peningkatan TIO (Basic and Clinical Science Course Section 1, 2023-2024).

Pada glaukoma sudut tertutup, iris perifer menyebabkan sumbatan baik parsial maupun total pada TM. Sumbatan ini disebabkan adanya perlekatan atau adhesi iridotrabekular yang biasa disebut *Peripheral Anterior Synechiae (PAS)*. Kondisi PAS yang berhubungan atau disertai dengan GON dikenal dengan istilah glaukoma sudut tertutup. Istilah primer dan sekunder pada glaukoma sudut tertutup tergantung pada ada atau tidaknya kondisi yang mendasari mekanisme timbulnya PAS (Basic and Clinical Science Course Section 1, 2023- 2024).

2.2. Patofisiologi glaukoma

Patogenesis terjadinya glaukoma cukup kompleks dan belum sepenuhnya diketahui secara pasti. Mekanisme potensial yang terlibat diduga merupakan peran dari faktor mekanis, vaskular, stress oksidatif, neuroinflamasi, eksitotoksisitas glutamate, dan apoptosis :

- **Hipotesis Mekanis**

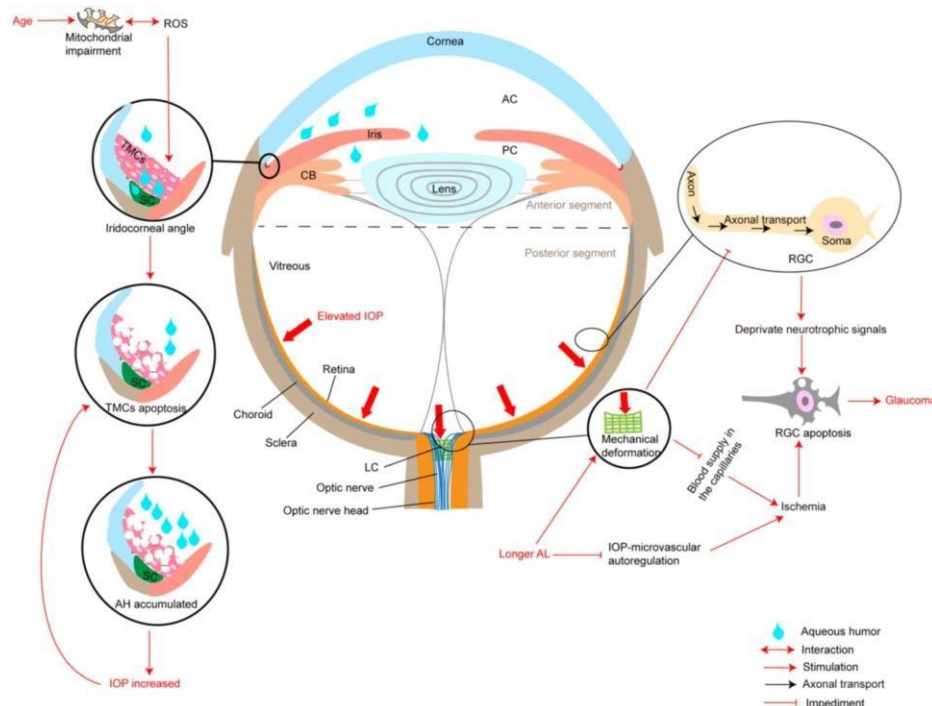
Hipotesis mekanis menjelaskan hubungan patomekanisme antara

TIO dan RGC. Lamina kribrosa yang memiliki struktur berlubang merupakan bagian terlemah dari sklera dan menjadi tempat masuk akson RGC untuk membentuk nervus optik, sedangkan untuk arteri maupun vena retina sentralis akan melewati lamina kribrosa melalui aperture yang lebih besar (Quigley HA, 2011).

Peningkatan TIO terjadi akibat adanya ketidakseimbangan antara produksi dan drainase HA sehingga lamina kribrosa terdesak kearah belakang secara ireversibel dan menyebabkan proses “*cupping*” (Li L. et al, 2020). Kondisi cupping nervus optik ditandai dengan adanya proses remodeling *Extracellular Matrix (ECM)* dan fibrosis pada lamina kribrosa (Irnatn M. et al, 2018). Sel dari lamina kribrosa pada glaukoma akan menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen ECM dan peningkatan kalsium intraseluler yang diketahui memicu proliferasi, aktivasi, serta kontraktilitas pada fibroblas melalui inti faktor dari jalur sel T/kalsium yang teraktivasi (Irnatn M. et al, 2018). Perubahan ini menyebabkan kerusakan pada nervus optik dan kapiler yang melewati lamina kribrosa, menghambat transportasi aksonal RGC secara anterograde, yang pada akhirnya menyebabkan defek lapang pandang pada glaukoma (Li L. et al, 2020). Selain itu, peningkatan TIO juga dapat mengakibatkan akumulasi ECM yang diinduksi oleh jalur profibrotik yang teraktivasi di TM sehingga menyebabkan aliran keluar HA menjadi terhambat dan terjadi kerusakan lamina kribrosa lebih lanjut (Zhavoronkov A. et al, 2016).

Studi eksperimental pada hewan coba monyet yang mengalami glaukoma oleh Ivers et al menunjukkan adanya peningkatan kedalaman permukaan lamina kribrosa anterior, kemudian diikuti dengan penurunan lebar neural rim, dan yang terakhir berkurangnya ketebalan *Retinal Nerve Fiber Layer (RNFL)*. Degenerasi akson RGC dan defisit transport aksonal secara anterograde di *Optic Nerve Head (ONH)* akan mendahului hilangnya RGC baik secara struktural maupun fungsional (Maddineni P. et al, 2020). Gangguan transport aksonal anterograde dari RGC menyebabkan akumulasi sisa metabolisme dalam sel dan menghilangkan kebutuhan metabolisme RGC yang kemudian

menyebabkan terjadinya apoptosis (Berdahl J. P. et al, 2020).



Gambar 2.2. Skematik hipotesis mekanik pada glaukoma menyebabkan remodelling lamina kribrosa dan ECM sehingga mengganggu transport aksonal dan suplai darah yang mengakibatkan terjadinya proses apoptosis.

Pada NTG juga didapatkan adanya ekskavasi glaukomatosa meskipun dengan kondisi TIO normal (Li L. et al, 2016). Hal ini disebabkan adanya peran dari tekanan gradien translaminar yang lebih tinggi pada pasien dengan glaukoma dan berhubungan dengan kerusakan mekanis pada serabut saraf optik, gangguan transportasi aksonal anterograde, perubahan aliran darah, yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan pada glaukoma (Siaudvytyte L. et al, 2014, Trivli A. et al, 2019, Burgoyne C. F., 2011).

- **Hipotesis vaskular :**

Pada hipotesis ini, aliran darah dari ONH secara signifikan mengalami hipoperfusi pada pasien glaukoma dan dikarakteristikan dengan glaukomatosa diskus optik dengan adanya defek lapang pandang (Shiga Y. et al, 2016 dan 2018). Pada hipotesis vaskular, terjadi hipoperfusi, gangguan autoregulasi vaskular, serta hilangnya neurovascular junction sehingga menyebabkan degenerasi nervus optik pada glaukoma. Hal ini masih menjadi pro dan kontra apakah disfungsi

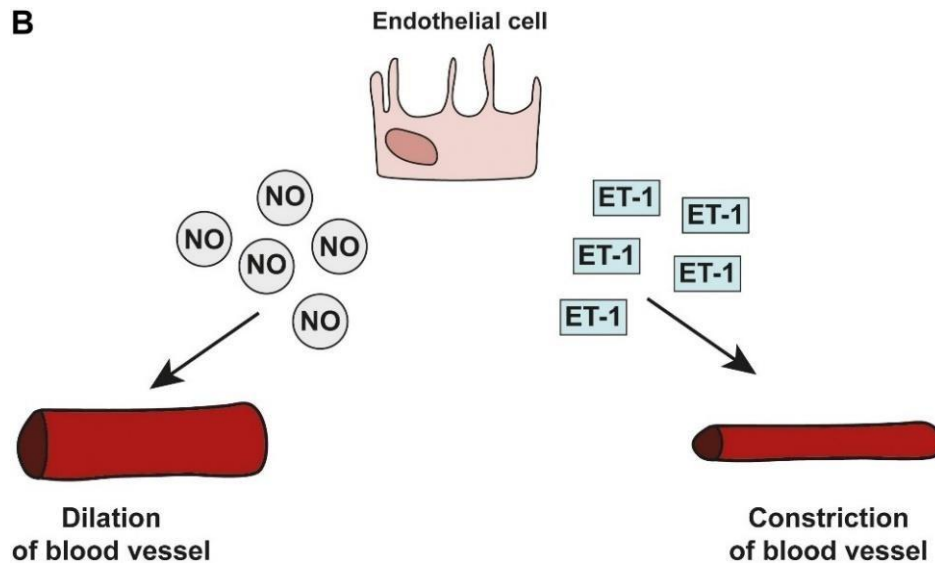
vaskular terjadi setelah degenerasi RGC atau sebaliknya yang disebabkan kerusakan pada neovascular junction (Abegao Pinto L. et al, 2016).

Disfungsi atau insufisiensi vaskular pada ONH dan retina dapat menyebabkan iskemia yang berkontribusi terhadap degenerasi RGC. Pada NTG, disfungsi vaskular mungkin menjadi faktor utama progresifitas penyakit melalui peningkatan stress oksidatif pada tingkat retina dan ONH. Kejadian hipoksia yang ringan dan berulang akibat fluktuasi TIO yang kecil dapat menyebabkan perfusi tidak stabil dan menghasilkan cedera iskemik reperfusi tingkat rendah yang kronis sehingga berbeda dengan hipoksia akibat peningkatan TIO akut. Namun kedua kondisi tersebut berpotensi menyebabkan stress oksidatif progresif sehingga mengganggu sumber daya metabolik yang dibutuhkan RGC dalam mengirimkan sinyal/impuls dari retina ke otak (Hayreh S. et al, 1970).

Metabolisme akibat aktivitas retina yang tinggi membutuhkan suplai perfusi yang cukup dan berpotensi menghasilkan produk oksidatif. Aliran darah ke ONH terutama disuplai oleh pembuluh darah peripapilari koroid melalui arteri siliaris posterior, sedangkan permukaan RNFL disuplai oleh arteri retina sentralis. Pengaturan aliran darah pada area ini melibatkan berbagai jalur metabolik dan vasoaktif. Autoregulasi dicapai melalui interaksi neurovascular dengan perubahan tonus pembuluh darah. Arteri akan berkontraksi dan berelaksasi sebagai respon terhadap peningkatan atau penurunan tekanan intravascular (Boltz A. et al, 2013)

Dua molekul vasoaktif utama yang memediasi tonus pembuluh darah dan aliran darah yaitu NO dan *Endothelin-1 (ET-1)*. NO merupakan vasodilator kuat yang dilepaskan oleh sel otot polos dan sel endotel yang bekerja melalui perisit untuk melebarkan kapiler. ET-1 adalah vasokonstriktor kuat yang dilepaskan sel endotel dan bekerja pada 3 reseptor utama : ET_A, ET_{B1}, dan ET_{B2}. Reseptor ET_A dan ET_{B2} terdapat di otot polos pembuluh darah dan memediasi vasokonstriksi, sedangkan ET_{B1} terdapat pada sel endotel dan memfasilitasi vasodilatasi. Dalam autoregulasi vaskular, keseimbangan antara konsentrasi NO dan ET-1 memediasi respon pembuluh darah yang tepat untuk mempertahankan

aliran darah. Pasien dengan GON memiliki respon autoregulasi yang abnormal akibat disfungsi sel yang terlibat dalam proses ini. Pemblokiran reseptor ET_A dan ET_B menyebabkan peningkatan aliran darah melalui retina, koroid, dan ONH (Howell G. R. et al, 2011).



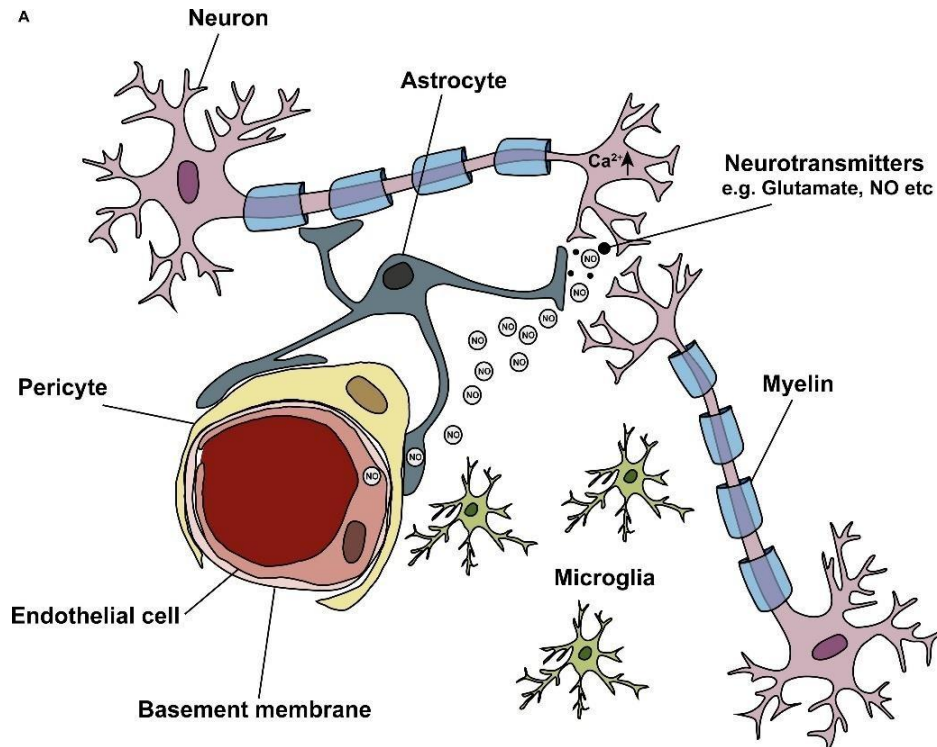
Gambar 2.3. Skematik peran vasoaktif pada pembuluh darah, NO menyebabkan vasodilatasi sedangkan ET-1 menyebabkan Vasokonstriksi.

Selain gangguan pada jalur ET-1, terdapat juga bukti bahwa gangguan sinyal NO berimplikasi pada glaukoma. NO adalah molekul pemberi sinyal berbentuk gas, namun konsentrasi yang tinggi dari NO dapat bersifat neurotoksik dan menginduksi stress oksidatif melalui pembentukan *Nitric Oxide Synthase (NOS)*. Dalam model tikus glaukoma, degenerasi RGC dikaitkan dengan peningkatan ekspresi NOS. Produksi NO oleh NOS di ONH sangat penting untuk mengendalikan tonus pembuluh darah di area tersebut. Disisi lain, laporan penurunan kadar NO dan *Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP)* ditemukan pada HA pasien POAG. Hilangnya RGC dikaitkan dengan defisiensi jalur pensinyalan NO-cGMP pada dua model hewan glaukoma. Perfusi mata yang buruk secara langsung merugikan RGC akibat terjadinya iskemik, stress oksidatif, dan kurangnya suplai metabolit (Wareham L. K. et al, 2018).

Peningkatan aktivitas saraf menyebabkan lonjakan kebutuhan *Adenosine Triphosphate (ATP)* dan perfusi ke area tersebut. Dalam

proses ini, peningkatan aktivitas saraf menyebabkan pelepasan glutamat oleh neuron presinaps menuju celah sinaps dan akan berikatan pada reseptor *N-Metil-D-Aspartat (NMDA)* sehingga terjadi peningkatan kadar *Calcium* (Ca^{2+}), hal ini akan memicu NOS untuk menghasilkan NO intraseluler. NO selanjutnya dapat secara langsung mengaktifkan kanal BKCa sehingga *Kalium* (K^+) akan menurun dan terjadi hiperpolarisasi sel. Hiperpolarisasi sel menyebabkan kanal Ca^{2+} menutup dan mengurangi masuknya Ca^{2+} sehingga terjadi vasodilatasi/relaksasi sel otot polos pembuluh darah dan peningkatan perfusi darah. Tiga tipe sel dari Neurovaskular unit adalah sel pembuluh darah (sel otot polos pembuluh darah, perisit, dan sel endotel), sel glial (astrosit, mikroglia, dan oligodendrosit), serta neuron. Perisit berfungsi serupa dengan otot polos dan sel endotel yang memiliki sejumlah ion dan transporter untuk memediasi perubahan diameter kapiler (Hughes S. et al, 2006).

Seperti halnya otot polos, perubahan tonus perisit dan kemampuan kontraktile dapat berubah sesuai kadar Ca^{2+} intraseluler. Perisit rentan terhadap kondisi iskemik sehingga retina yang iskemik akan mengurangi kemampuan perisit untuk berelaksasi setelah mengalami penyempitan dan menyebabkan penurunan perfusi lebih lanjut. Perisit juga mengekspresikan sejumlah protein gap-junction yang memfasilitasi komunikasi antar sel. Gangguan ekspresi gap-junction diduga berperan dalam menyebabkan disfungsi vaskular pada glaukoma. Astrosit yang reaktif terbukti menghasilkan NO dalam jumlah berlebih melalui aktivasi *inducible-Nitric Oxide Synthase (iNOS)* sehingga meningkatkan radikal bebas dan menyebabkan kerusakan pada akson akibat stress oksidatif (Hughes S. et al, 2006).



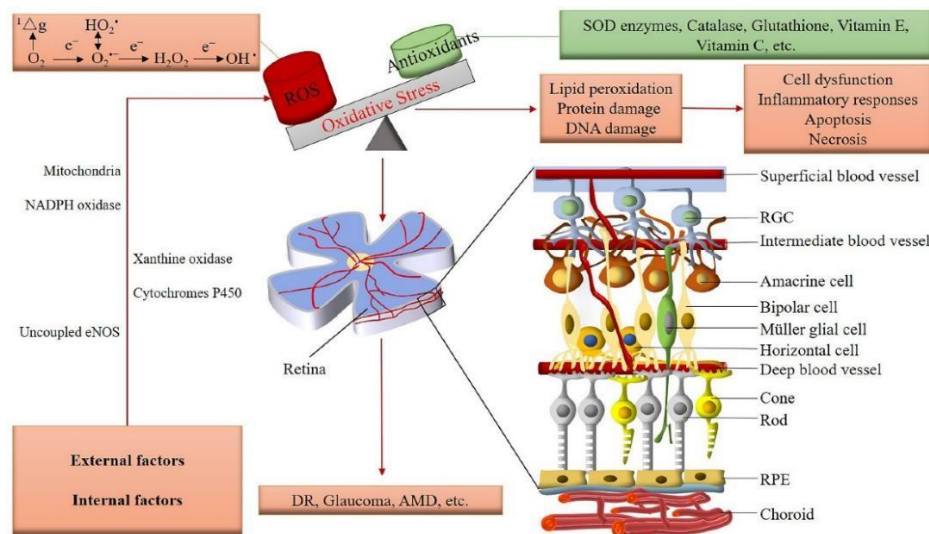
Gambar 2.4. Peran neovaskular unit pada glaukoma yang ditandai peningkatan kadar kalsium menyebabkan ekspresi berlebihan dari NO dan menyebabkan efek neurotoksik serta stress oksidatif.

- **Hipotesis stres oksidatif dan inflamasi**

Berdasarkan studi yang dilakukan pada hewan coba, hasil yang sesuai juga didapatkan pada pasien yang mengalami glaukoma dimana terjadi peningkatan stres oksidatif. Kadar biomarker molekuler untuk stres oksidatif seperti protein karbonil dan hasil akhir glikasi dalam darah serta HA secara signifikan mengalami peningkatan pada pasien glaukoma dibandingkan pasien kontrol (Hondur G. et al, 2017). Demikian pula pada pasien PACG yang menunjukkan penurunan kadar serum *Total Antioxidant Status (TAS)* dan *Superoxide Dismutase (SOD)*, serta peningkatan kadar *Malondialdehyde (MDA)* dibandingkan kelompok kontrol yang sehat (Li S. et al, 2020).

Sebuah studi meta-analisis pada pasien POAG juga menunjukkan adanya kadar TAS yang lebih rendah dalam darah dan SOD, *Glutathione Peroxidase (GPX)*, serta *Catalase (CAT)* yang lebih tinggi dalam HA (Tang B. et al, 2019). Stres oksidatif dapat menginduksi terjadinya peradangan saat terjadi degenerasi nervus optik

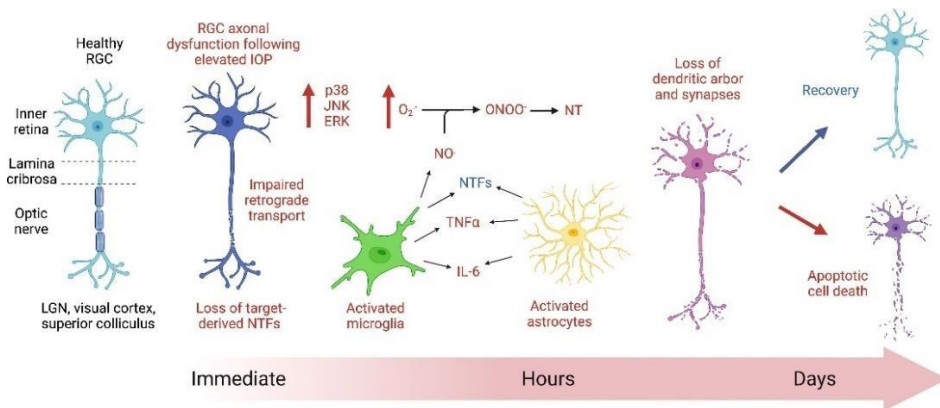
yang disebabkan oleh karena glaukoma. Studi menunjukkan bahwa peradangan dapat berkontribusi terhadap progresifitas glaukoma. Pada nervus optik pasien glaukoma, jumlah sel CD163+ yang merupakan penanda untuk makrofag antiinflamasi yang terlibat dalam perbaikan serta remodeling jaringan mengalami peningkatan secara signifikan (Margeta M. A. et al, 2018). Penanda lain dari status inflamasi sistemik yaitu rasio neutrofil terhadap limfosit, rasio trombosit terhadap limfosit, dan indeks inflamasi imun sistemik terjadi peningkatan yang signifikan pada pasien POAG dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tang B. et al, 2020).



Gambar 2.5. Mekanisme stres oksidatif pada glaukoma akibat ketidakseimbangan ROS dan antioksidan yang dipicu faktor eksternal dan internal menyebabkan kerusakan protein, DNA, dan peroksidase lipid sehingga terjadi apoptosis atau nekrosis.

Pasien POAG juga menunjukkan peningkatan sitokin seperti IL4, IL6, serta TNF- α dibandingkan kelompok kontrol (Huang P. et al, 2010). Selain itu, pada studi lain menunjukkan adanya peningkatan signifikan kadar eotaxin, protein inflamasi makrofag-1-alpha, *Interferon Gamma (IFN- γ)* namun terjadi penurunan kadar TNF- α , IL5, IL9, IL17, serta granulosit makrofag dibandingkan kelompok kontrol (Duvesh R. et al, 2017). Sel glia di retina seperti astrosit, sel muller, dan sel mikrogliial yang berperan sebagai mediator inflamasi mengalami peningkatan dan menyebabkan produksi sitokin inflamasi sehingga terjadi kerusakan saraf pada glaukoma. Bukti yang ada saat

ini menunjukkan peran peradangan saraf dalam patogenesis glaukoma, namun masih belum jelas kapan peradangan saraf berperan dalam rangkaian kejadian patologis pada glaukoma. Kondisi peradangan pada saraf diduga terjadi secara sekunder akibat kerusakan nervus optik (Mac Nair C. E. et al, 2016).



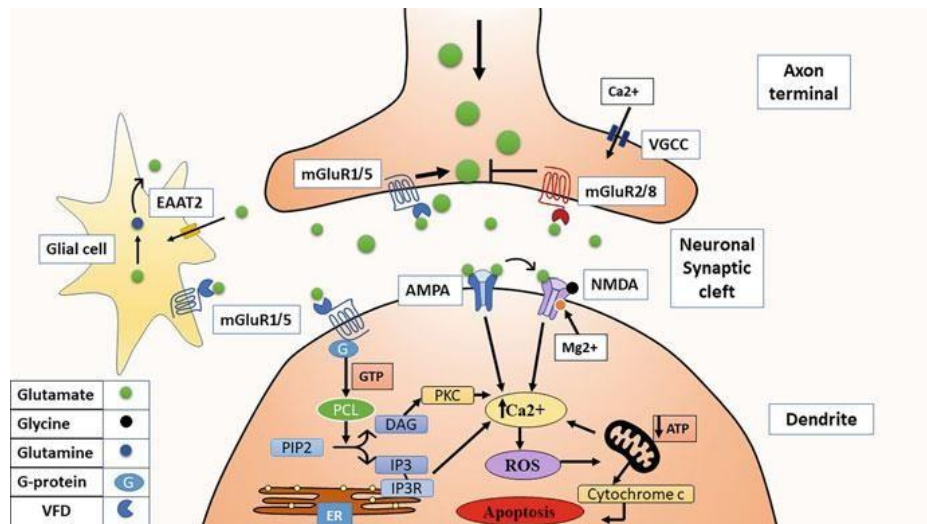
Gambar 2.6. Mekanisme neuroinflamasi pada glaukoma yang disebabkan peningkatan TIO menyebabkan gangguan transport aksonal dan mengaktivasi mikroglia dan astrosit. Hal ini memicu pelepasan mediator inflamasi dan mengakibatkan apoptosis.

- **Hipotesis eksitotoksitas glutamat**

Sel glial di retina berperan penting untuk homeostatis dan metabolik pada fotoreseptor dan neuron retina (Reichenbach A. et al 2020). Sel muller dan astrosit berperan dalam sistem regulasi neurotransmitter melalui *Glutamate Aspartate Transporter (GLAST)* yang juga dikenal sebagai *Excitatory Amino Acid Transporter-1 (EAAT-1)* pada manusia. Pada mata dengan glaukoma telah terbukti mengalami penurunan kadar EAAT-1 dan subunit reseptor Glutamat NMDA-R1 (Naskar R. et al, 2000).

Pada hewan coba tikus yang mengalami penurunan kadar LAST menunjukkan hilangnya RGC secara spontan dan degenerasi nervus optik tanpa peningkatan TIO. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan ekspresi GLAST menyebabkan eksitotoksitas glutamat di retina dan merupakan patogenesis glaukoma (Harada T. et al, 2007). Saat ini, hipotesis yang paling diterima dan terlibat dalam patogenesis glaukoma mencakup kerusakan mekanis pada ONH yang disebabkan oleh karena peningkatan TIO dan diikuti adanya disregulasi vaskular (penurunan

aliran darah okular) serta peradangan saraf (aktivasi glial) yang kemudian mengganggu transportasi aksonal. Hilangnya fungsi mitokondria aksonal pada RGC menyebabkan degenerasi aksonal RGC dan kematian sel RGC (Osborne N. N. et al, 2016, Muench N. A. et al, 2021, Evangelho K. et al, 2019).



Gambar 2.7. Patomekanisme eksitotoksisitas glutamat pada glaukoma dipicu glutamat yang berlebih sehingga peningkatan kalsium menyebabkan peningkatan ROS dan terjadi apoptosis.

- **Hipotesis Apoptosis**

Apoptosis pertama kali dijelaskan oleh Kerr et al pada tahun 1970 dan telah menjadi bagian penting dalam mengeksplorasi patogenesis penyakit. Apoptosis memainkan peran penting dalam menjaga homeostasis jaringan dan memastikan perkembangan alami organisme (Elmore S., 2007). Apoptosis yang terjadi pada sel normal atau sel yang rusak dipicu oleh berbagai rangsangan seperti ROS, stress retikulum endoplasma, ion Ca²⁺, peradangan, dan gangguan DNA. Tanda morfologi yang khas dari apoptosis meliputi kerusakan membrane sel untuk membentuk tonjolan tunas, dehidrasi dan kondensasi sitoplasma, konsolidasi inti, lisis nucleolar, kondensasi kromatin, pembentukan badan apoptosis dan degradasi melalui fagositosis. Perubahan morfologi dalam apoptosis disertai dengan proses biokimia yang kompleks termasuk fragmentasi DNA, pengaktifan kaspase, peningkatan permeabilitas mitokondria, peningkatan Ca²⁺ sitoplasma, dan ectopia fosfatidilserin (Saraste A. dan Pulkki K., 2000).

Apoptosis dilakukan melalui rangkaian jalur apoptosis instrinsik dan ekstrinsik yang mengaktifkan keluarga sistein protease dan pembelahan banyak substrat. Pada model tikus glaukoma paska operasi atau trauma kornea, TNF- α dan sitokin inflamasi lain diproduksi pada segmen anterior dan menyebar dengan cepat ke segmen posterior di retina dan menyebabkan apoptosis pada RGC yang diketahui sebagai penyebab neuropati optik glaucoma (Dohlman C. H. et al, 2019). Jalur apoptosis instrinsik (mitokondria) dan ekstrinsik (reseptor kematian) adalah dua jalur yang umum digunakan untuk menjelaskan mekanisme apoptosis pada glaukoma. Jalur ekstrinsik merupakan jalur yang familiar dipicu oleh sinyal kematian termasuk TNF- α dan *Fas Ligand (FasL)*. Dalam jalur ini, reseptor TNF- α dan Fas membantuk mengirimkan sinyal kematian dari permukaan sel ke jalur intraseluler melalui domain kematian. Domain kematian kemudian akan merekrut protein adaptor seperti protein Fas, TNFR1, dan protease sistein seperti caspase 8. Selanjutnya kompleks pensinyalan akan menginduksi suatu kompleks protein ligan reseptor adaptor untuk selanjutnya berikatan dengan reseptor kematian dan mengaktifkan caspase 8 sehingga memulai proses apoptosis (Wilson N. S. et al, 2009). Jalur instrinsik dipicu dengan adanya rangsangan (zat toksik, ROS, penuaan) yang akan melekat dan merusak struktur serta fungsi mitokondria pada glaukoma. Rangsangan akan menginduksi terbukanya pori-pori transisi permeabilitas mitokondria dan menghambat potensi transmembrane mitokondria sehingga mempercepat pelepasan protein proapoptosis seperti *Cytochrome C (CytC)* dan *Apoptotic Inducing Factor (AIF)* dari mitokondria ke sitoplasma. *Apoptotic Protease Activating Factor-1 (Apaf-1)* mengalami oligomerisasi sebagai respon terhadap pelepasan CytC dan membentuk heptamer berbentuk cakram yang disebut *apoptosom*. Apoptosom selanjutnya merekrut dan mengaktifkan procaspase 9 yang merupakan inisiator caspase di jalur mitokondria yang mengarah pada proses caspase hilir yaitu caspase 3 (Brentnall M. et al, 2013).

Proses yang dimulai oleh mitokondria dimediasi oleh *B-Cell Lymphoma-2 (Bcl-2)* yang berada di membrane luar mitokondria dan

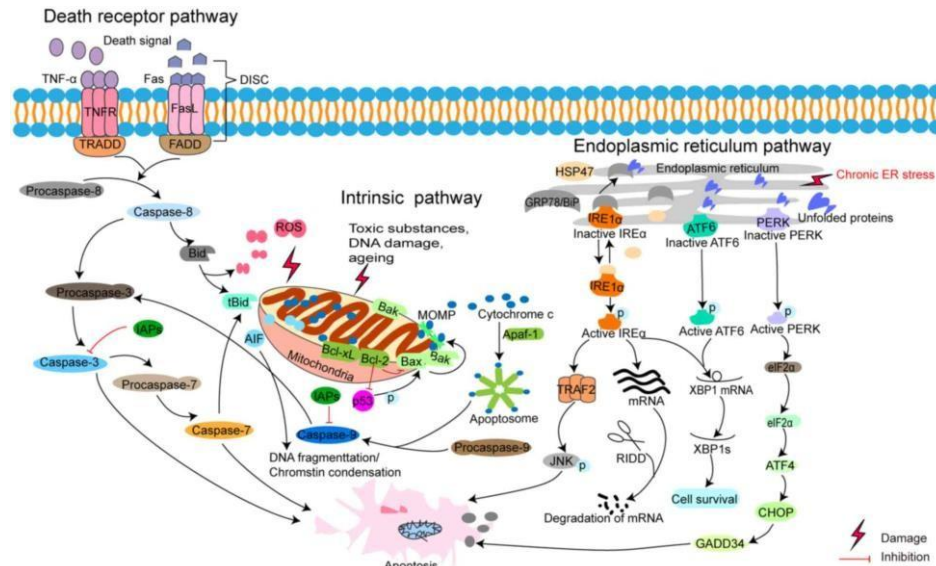
mengatur *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP)* sehingga melepaskan Cytc. Bcl-2 memiliki 4 domain (BH1-BH4) dimana BH3 dari protein proapoptosis (Bax, Bak) diperlukan untuk pelaksanaan apoptosis instrinsik (Kale J. et al, 2018). Berdasarkan fungsinya dalam mengatur MOMP, Bcl-2 diklasifikasikan menjadi 3 kategori. Kategori pertama merupakan anggota antiapoptosis (Bcl-2, *B-Cell Lymphoma-Extra Large/Bcl-xl*), protein ini menghambat Bax di MOMP. Kategori kedua anggota proapoptosis yang terdiri dari (Bax, Bak, Bok) yang menginduksi pembentukan MOMP dan pelepasan Cytc ke sitoplasma. Kategori ketiga terdiri dari (Bid, Bim) yang berinteraksi dengan Bcl-2 yang memodulatori apoptosis oleh P53. Selain itu Bcl-2 menghambat apoptosis yang dimediasi P53 dan aktivasi transkripsional. Caspase inisiator jalur instrinsik adalah caspase 9 sedangkan pada jalur ekstrinsik adalah caspase 8, keduanya menyatu menjadi caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor untuk apoptosis (Brentnall M. et al, 2013).

Jalur apoptosis ketiga dimediasi oleh *Endoplasmic Reticulum Stress (ERS)* yang penting untuk kelangsungan hidup sel. ERS adalah kondisi dimana beberapa gangguan fisiologis dan patologis menghambat kemampuan sel untuk melipat dengan benar dan memodifikasi protein sekretori dan transmembrane di *Retikulum Endoplasma (RE)* dengan benar yang mengakibatkan akumulasi protein salah lipat di lumen RE. Ketika kesalahan lipatan protein berlanjut atau berlebih akan memicu kematian sel atau apoptosis (Hetz C. et al, 2020). *Unfolded Protein Response (UPR)* diaktifkan oleh tiga protein RE transmembran, yaitu *Activating Transcription Factor-6 (ATF6)*, enzim yang membutuhkan *Inositol Requiring Endoribonuclease 1 α (IRE1 α)* dan *Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK)*. Sensor ERS ini memiliki domain umum, yaitu domain RE-luminal, yang merasakan konsentrasi tinggi protein yang salah lipatan untuk mengubah keadaan oligomerisasi setiap sensor dan mengaktifkan sinyal molekuler hilirnya. Bentuk *phosphorylation- IRE1 α (p-IRE1 α)* yang terfosforilasi mengaktifkan gen pendamping dan juga mengaktifkan *Jun N-terminal Kinase (JNK)* dengan berikatan dengan *TNF Receptor Associated Factor 2 (TRAF2)* (Urano F. et al, 2000).

Pada model tikus percobaan glaukoma, *protein-Jun N-Terminal Kinase p-JNK* meningkat dan mungkin berperan dalam kematian RGC. Dengan demikian, diasumsikan bahwa jalur pensinyalan IRE1 α -JNK terlibat dalam ERS glaukoma. Selain itu, p-IRE1 α memulai penyambungan *messenger Ribo Nucleic Acid (mRNA)* dari *X-box Binding Protein 1 (XBP1)* untuk menghasilkan pergeseran bingkai yang kodenya mengkodekan faktor transkripsi yang kuat, XBP1s. XBP1 memasuki nukleus dan memulai transkripsi subset gen terkait UPR yang terkait dengan pelipatan protein, sekresi, degradasi terkait ER, dan sintesis lipid (Hwang J. dan Qi L., 2018). Selain itu, p-IRE1 α terlibat dalam proses peluruhan yang bergantung pada IRE1 yang diatur untuk mendorong degradasi mRNA dan memperlambat sintesis rantai polipeptida baru, sehingga mengurangi ERS. Dengan demikian, IRE1 α adalah protein penting yang mengatur kelangsungan hidup sel atau menginduksi apoptosis sebagai respons terhadap ERS di sekitarnya (Maurel M. et al, 2014).

PERK diaktifkan dengan cara yang mirip dengan IRE1 α . Aktivasi PERK menginduksi redaman translasi *Phosphorylation of the eukaryotic Initiation Factor 2 (p-eIF2 α)*. Di bawah ERS yang berlebihan atau berkepanjangan, p-eIF2 α menerjemahkan *Activating Transcription Factor 4 (ATF4)*, yang selanjutnya menginduksi ekspresi faktor transkripsi lainnya, *C/EBP Homology Protein (CHOP)* dan *Activating Transcription Factor 3 (ATF3)*, sehingga berpartisipasi dalam proses proapoptosis. Ekspresi ATF4 dan CHOP meningkat secara signifikan pada sel TM glaukoma manusia (Peters J. C. et al, 2015). Namun, pada glaukoma model tikus DBA/2J, model glaukoma tikus hipertensi okular yang terjadi secara alami dan berkaitan dengan usia, meskipun CHOP memainkan peran kecil dalam berkontribusi terhadap apoptosis soma RGC, hal ini tidak menyebabkan degenerasi aksonal. Studi tambahan telah mengkonfirmasi bahwa jalur eIF2 α /ATF4/CHOP menginduksi apoptosis sel TM pada glaukoma eksperimental. Demikian pula, *Activating Transcription Factor 6 (ATF6)* mengaktifkan faktor transkripsi target, XBP1, untuk melakukan efek pro-survival. XBP1 mRNA diinduksi oleh ATF6 dan disambung oleh IRE1 α untuk membentuk bentuk XBP1 yang disambung. Sel

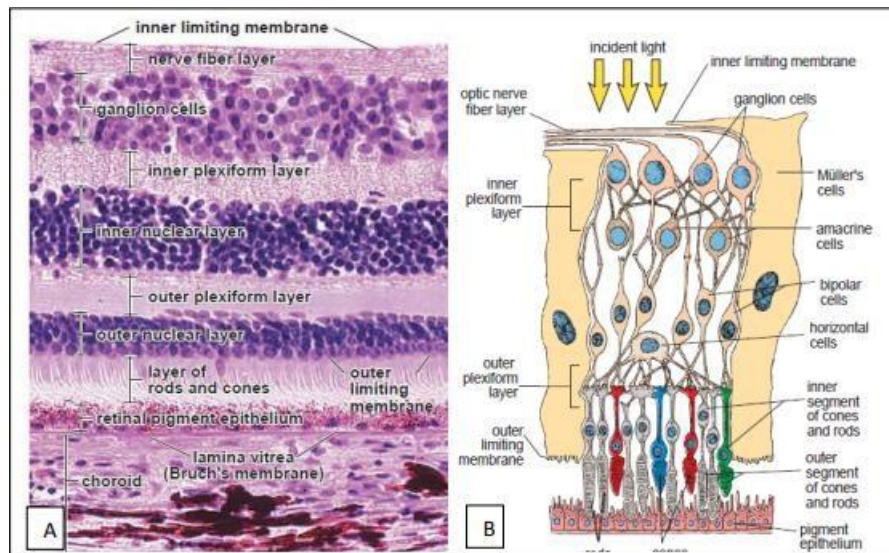
TM yang diobati dengan DEX menunjukkan bahwa IRE1, ATF6 dan *Glucose Regulated Protein 78 (GRP78)* mengalami penurunan regulasi. Sebuah penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa hilangnya ATF6 memperburuk degenerasi retina (Lee E. J. et al, 2021).



Gambar 2.8. Patomekanisme apoptosis pada glaukoma yang distimulasi pelepasan Cytc dari mitokondria oleh gen Proapoptosis (Bax, Bak), kemudian ditangkap oleh Apaf-1 diubah menjadi Apoptosome sehingga menstimulasi Caspase yang akan bergabung dengan Caspase 8 menjadi Caspase eksekutor (Caspase 3) untuk menyebabkan apoptosis.

2.3. Retinal Ganglion Cell

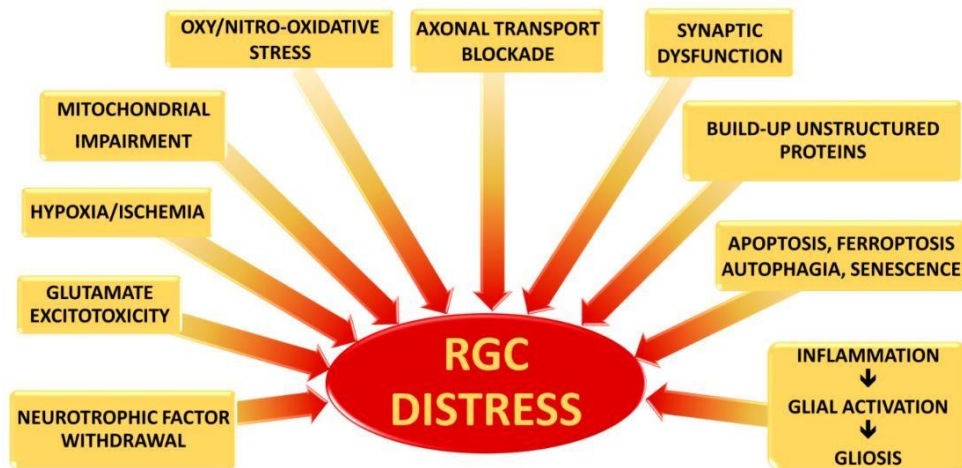
RGC merupakan populasi neuron sistem saraf pusat yang memanjang dengan soma ke retina bagian dalam dan aksonnya ke nervus optik. RGC sekaligus merupakan sel saraf retina yang pertama kali terbentuk selain sel horizontal, amakrin, serta bipolar (Wang Y., 2005). RGC mengontrol berbagai peristiwa molekuler, pada tahap perkembangannya akson RGC akan membentuk lapisan serabut saraf retina yang berkaitan erat dengan migrasi astrosit. RGC beserta aksonnya bertanggung jawab untuk mengirimkan semua informasi visual dari mata ke otak (Nukleus genikulatum lateral dan kolikulus superior) melalui nervus optik (Mead B. dan Tomarev S., 2016).



Gambar 2.9. Gambaran anatomi dan histologi retina yang menggambarkan kepadatan atau densitas sel pada tiap lapisan.

Diantara jenis neuron yang lain, RGC memiliki morfologi dan kebutuhan energi yang tinggi serta rentan terhadap disfungsi mitokondria. Pada faktanya, akson RGC yang tidak bermielin didalam retina menyebabkan kebutuhan mitokondria yang lebih tinggi untuk merespon permintaan metabolik yang tinggi (Duarte J. N., 2021). Oleh sebab itu, ketersediaan RGC dengan energi yang besar, integritas mitokondria, dinamika, transportasi serta proses degradasi seperti mitofagi sangat diperlukan. Adanya defisit mitokondria seperti halnya pada kasus degeneratif menyebabkan pasokan energi yang tidak memadai yang terlibat dalam degenerasi RGC (Ito Y. A., 2017 dan Sacca S. C. et al, 2020).

Beberapa penyakit dapat terjadi akibat disfungsi pada akson RGC meliputi neuropati optik glaukoma, neuropati optik inflamasi, neuropati optik iskemik, neuropati optik traumatic, neuropati optik hereditas, serta neuropati optik toksik (You Y. et al, 2013). Secara khusus, karakteristik neuropati dan berbagai jenis glaukoma meliputi defisit penglihatan permanen yang dimulai dengan hilangnya penglihatan perifer dan semakin memburuk sehingga disebut dengan istilah *Tunnel vision* (Sharif N., 2018). Meskipun mekanisme pasti kematian RGC pada glaukoma belum begitu jelas, namun tiga penyebab utama progresifitas kerusakan dapat disebabkan adanya *blockade transport axonal*, *eksitotoksitas glutamate*, serta *perubahan sitokin proinflamasi* sepanjang proteksi RGC.



Gambar 2.10. Faktor risiko yang berkontribusi menyebabkan kerusakan pada RGC.

Transportasi akson merupakan suatu proses yang penting dalam kelangsungan hidup neuron dan secara keseluruhan dibutuhkan untuk keseimbangan metabolik dan neurotransmisi intraseluler. Hal ini juga memungkinkan neuron untuk merespon adanya sinyal stress atau kerusakan secara efektif. Transpor aksonal dibedakan menjadi anterograde dan retrograde. Transportasi akson anterograde menyediakan protein dan lipid dari soma menuju sinaps bagian distal serta memasok energi lokal melalui pergerakan mitokondria di mikrotubulus, sedangkan transportasi aksonal retrograde akan terlibat dalam pembuangan protein yang salah lipat dari akson serta transportasi sinyal trofik intraseluler ke soma untuk mencegah efek toksik (Millecamps S. dan Julien J., 2013, Perlson E. et al, 2010).

Transportasi akson sepanjang mikrotubulus dapat dibagi menjadi cepat ($0.5-4 \mu\text{m/s}$) dan lambat ($0.01-0.05 \mu\text{m/s}$) berdasarkan jenis muatan yang diangkut (Millecamps S. dan Julien J., 2013, Lasek R. J. et al, 1984). Hal ini berkaitan erat dengan motor molekuler kinesin dan dynein yang mana kedua penggerak protein tersebut membutuhkan ATP untuk mendorong muatan mereka sepanjang mikrotubulus. Kinesin akan terlibat dalam transportasi anterograde sedangkan dynein sebaliknya (Morgan J. E., 2004). Saat ini diketahui bahwa adanya kerusakan transport akson menyebabkan disfungsi satu atau lebih komponen seperti motor molekuler, mikrotubulus, mitokondria, dan vesikel sehingga menyebabkan kecenderungan terhadap penyakit neurodegenerative seperti Alzheimer,

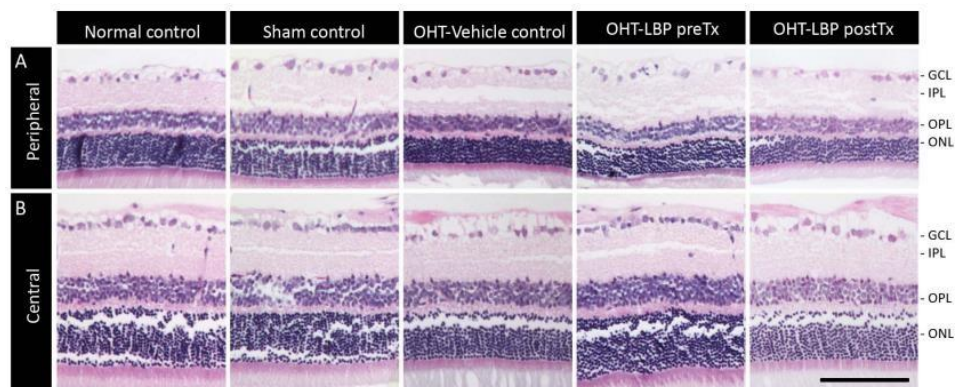
demensia, Parkinson, serta glaukoma (De Vos K. J. et al, 2008, Fahy E. T. et al, 2015).

Pada glaukoma, paparan kadar oksigen dan energi yang rendah, neurotoksin, peningkatan gradien tekanan di akson RGC, serta sitokin proinflamasi akan memicu defisit transport aksonal anterograde diikuti defisit transport aksonal retrograde dari RGC (Quaranta L. et al, 2021, Ito Y. A., 2017). Blokade transport aksonal secara progresif akan menyebabkan terjadinya deprivasi neurotropik sehingga terjadi kematian RGC (Hirooka K. et al, 2021). *Neurotrophic Factor (NTF)* sangat penting untuk kelangsungan hidup sistem saraf. NTF secara umum meliputi *neurotrophin*, *Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (GDNF)*, dan *Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)* (Kimura A. et al, 2016).

Neurotrophin (NT) merupakan keluarga polipeptida dengan berbagai fungsi baik pada tingkat sistem saraf pusat dan perifer mulai dari menjaga kelangsungan hidup neuron hingga modulasi trans sinaptik (Platholi J. dan Lee F. S., 2018). Terdapat 4 NT diantaranya *Nerve Growth Factor (NGF)*, *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*, *Neurotrophin 3 (NT-3)*, dan *Neurotrophin 4/5 (NT-4/5)*. BDNF merupakan NT yang sangat penting untuk kelangsungan hidup RGC, selain diproduksi oleh RGC dan astrosit pada retina, BDNF juga berperan dalam transport aksonal retrograde (otak ke retina) (Fathy M. et al, 2020 dan Johnson T. V. et al, 2011). BDNF diproduksi oleh kolikulus superior atau nukleus genikulatum lateral dan berikatan dengan reseptor *Tropomyosin receptor kinase B (TrkB)* untuk mencapai soma melalui transportasi retrograde dalam vesikel microsomal (Martin K. R. G. et al, 2003).

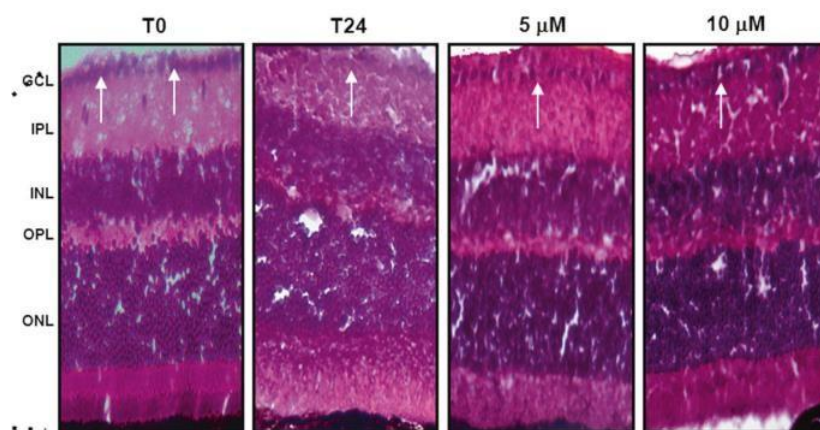
Pada Tingkat glia dan muller, GDNF mampu meningkatkan ekspresi GLAST yang penting untuk perlindungan RGC. GLAST bersama *Glutamate Trasporter-1 (GLT-1)* yang terletak di terminal sel bipolar dan *Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1)* dalam neuron retina termasuk RGC berperan dalam mekanisme pembuangan glutamate dari cairan ekstraseluler di retina. Selain itu, GLAST juga penting untuk sintesis glutathione dan antioksidan di seluler retina (Koeberle P. D. dan Bahr M., 2008).

Studi oleh Lakshmanan et al yang menggunakan modalitas pemeriksaan histopatologi untuk melihat struktur dari lapisan retina secara histologi menunjukkan bahwa pemberian Lycium barbarum mampu menghentikan Sebagian degenerasi dan mempertahankan densitas RGC serta fungsi retina pada hewan coba model OHT (Lakshmanan Y. et al, 2019).



Gambar 2.11. Perbedaan densitas RGC pada kelompok kontrol dan kelompok yang diberikan intervensi dengan Lycium Barbarum Polysaccharides pada tikus model OHT.

Bucarello et al juga melaporkan hal yang sama dengan variable yang berbeda, pemberian ekstrak curcumin dilaporkan mampu mencegah RGC loss serta memberikan efek protektif terhadap ketebalan lapisan retina berdasarkan pemeriksaan histopatologi retina (Buccarello L. et al, 2021).



Gambar 2.12. Perbedaan ketebalan dan densitas RGC yang diperiksa dengan pewarnaan *Hematoxylin dan Eosin (HE)* menunjukkan perbedaan pada kelompok kontrol dan kelompok yang diberikan curcumin dengan dosis 5 μ M dan 10 μ M pada tikus model glaukoma.

2.4. Peran produk nabati esensial dan mekanisme aksinya sebagai terapi pada glaukoma

Penemuan senyawa aktif tumbuhan seperti morfin yang berasal dari opium di era modern dimulai sejak abad ke 19 (Bourne R. R. et al, 2010). Terapi pada glaukoma awalnya bergantung pada terapi herbal yang masih bersifat empiris. Salah satu senyawa aktif dari tanaman pertama yang digunakan untuk terapi glaukoma adalah Pilocarpine - alkaloid parasimpatomimetik yang diekstraksi dari *Pilocarpus microphyllus* (Tham Y. C. et al, 2019). Pilocarpine bekerja dengan berkontraksikan otot siliaris sehingga memfasilitasi aliran keluar HA melalui jalinan TM (Bajwa M. N. et al, 2019). Meskipun pilocarpine masih tersedia untuk terapi glaukoma, namun penggunaannya telah berkurang mengingat sedian obat glaukoma lain dengan potensi efek samping yang lebih minimal (Tharmathurai S. et al, 2021).

Saat ini industri farmasi terus mengembangkan potensi produk nabati dengan mengisolasi senyawa aktif dari tanaman obat dengan teknik standar. Di Amerika Serikat, *Food and Drug Administration (FDA)* telah memberlakukan praktek standar ini. FDA tidak mengatur kategori obat yang harus ditebus dengan resep atau merupakan obat bebas pada obat alternatif sehingga tidak diperlukan studi keamanan dan kemanjuran untuk menjual obat ini (Chandramohan H. et al, 2017). Terapi alternatif memiliki pasaran global sekitar 109 miliar dollar dan telah digunakan secara luas oleh 52% populasi umum (Chen M. et al, 2019, Han X. et al, 2019).

Mengingat peran stress oksidatif dan peradangan pada saraf, penggunaan antioksidan saat ini merupakan pendekatan alternatif untuk terapi glaukoma. Terapi yang masih rutin digunakan saat ini untuk pengobatan glaukoma adalah dengan menggunakan agen penurun TIO (Lusthaus J. et al, 2019). Selain itu, berdasarkan European Glaucoma Society beberapa tindakan lain yang dapat dilakukan yaitu laser trabekuloplasti, siklodestruksi, trabekulektomi, trabekulotomi, skleretomi dalam, dan viskoanalostomi. Namun beberapa kasus glaukoma yang telah dilakukan kombinasi terapi diatas masih mengalami progresifitas penyakit meskipun target TIO telah tercapai (European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 2017).

Beberapa studi menunjukkan penggunaan terapi adjuvan dengan menggunakan produk nabati esensial sebagai neuroprotektor pada glaukoma. Dalam beberapa survey yang melibatkan 1.516 pasien glaukoma di Kanada, 10% menggunakan produk nabati esensial khusus untuk glaukoma dan dipercaya bermanfaat untuk glaukoma. Hasil survey lain juga menunjukkan prevalensi penggunaan produk nabati esensial di arab Saudi dan Palestina masing-masing sebesar 22% dan 67% (Al-Salman S. et al, 2021, Jaber D. et al, 2021).

2.5. Ginkgo biloba sebagai produk nabati esensial dalam menghambat progresifitas glaukoma

Ginkgo Biloba (GB) termasuk famili Ginkgoaceae yang daun serta bijinya dimanfaatkan untuk pengobatan sejak lama. Lebih dari 70 jenis flavonoid telah diidentifikasi dalam GB dan berpotensi sebagai penangkal radikal bebas berspektrum luas (Liu X. G. et al, 2015). Kandungan biokaktif utama EGB yang berpotensi sebagai terapi yaitu terpenoid, flavonoid, polifenol, dan asam organik (Tomino C. et al, 2021). EGB yang terstandarisasi (EGB 761) mencakup 6% total terpenoid trilactone, 24% total flavonol glycosides, serta 5 ppm ginkgolic acids (Van Beek, T. A. et al, 2009). Studi *National Toxicology Program (NTP)* melaporkan penggunaan ekstrak terstandarisasi dengan dosis berbeda diantaranya 15,4% terpenoid trilactone, 31,2% flavonol glycosides, dan 10,45 ppm ginkgolic acids seperti yang dilampirkan pada tabel 2.2. Ekstrak ini dilaporkan memiliki karakteristik berupa bubuk coklat dengan aroma yang tidak melebihi 20 ppm metal dan 2 ppm arsen (National Toxicology Program, 2013).

EGB telah digunakan secara luas sebagai terapi herbal dengan memanfaatkan efek anti inflamasi, stimulasi kognitif, antioksidan, dan efek vaskuler dengan dosis harian mencapai 120 hingga 240 mg (American Botanical Council, 2000). Secara umum, data toksik secara kinetik EGB diharapkan tidak ditemukan oleh karena campuran kandungan yang kompleks. Studi farmakokinetik terkait EGB terus dikembangkan terutama kandungan aktif utama pada EGB yang dilaporkan bahwa EGB dapat dengan mudah diabsorpsi setelah pemberian oral. Studi pada tikus menunjukkan hasil farmakokinetik berdasarkan aktifitas spesifik pada

darah didapatkan waktu paruh EGB mencapai 4,5 jam dan diabsorpsi disaluran pencernaan bagian atas (National Toxicology Program, 2013). Hal ini serupa dengan studi yang dilakukan Salvador yang melaporkan *Lethal Dose 50 (LD₅₀)* dari EGB 761 yang diberikan secara oral pada tikus mencapai 7730 mg/kg (Salvador R. L., 1995). Namun, pemberian secara intravena mencapai 1100 mg/kg pada studi yang dilakukan pada tikus (National Toxicology Program, 2013). Saat ini belum ada bukti kerusakan atau gangguan organ baik hati maupun ginjal ketika menggunakan EGB 761 yang diberikan secara oral selama 27 minggu dengan dosis 100-1600 mg/kg (Salvador R. L., 1995).

Pada studi lain yang dilakukan Abdulrazak et al pada tahun 2018 pada hewan coba tikus yang dilakukan uji toksisitas EGB 761 mulai dari dosis 10 mg/kgbb hingga 5000 mg/kgbb tidak menunjukkan adanya kematian hewan coba maupun efek toksik, sehingga hasil ini menunjukkan bahwa EGB relatif aman untuk digunakan dengan nilai LD₅₀ melebihi 5000 mg/kgbb (Abdulrazak S. et al 2018).

Tabel 2.2. Kandungan utama EGB (%)

Class	Identified	Standarized EGB 761	Range (%)	NTP Study Extract
<u>Terpene tricaltone</u>	Total	6	0.07-14.23	15.4
	Bilobalide		0.03-8.64	6.94
	Ginkgolide A		0.01-2.90	3.74
	Ginkgolide B		< 0.005-1.75	1.62
	Ginkgolide C		< 0.005-1.75	3.06
	Ginkgolide J		0.03-0.78	Not measured
<u>Flavonol glycosides</u>	Total	24	0.18-35.54	31.2
	Quercetin		< 0.01-8.34	16.71
	Kaempferol		0.02-5.57	12.20
	Isorhamnetin		0.04-1.13	2.37
<u>Alkylphenols</u>	<u>Ginkgolic acids</u>	≤ 0.0005	<0.0005-9.0	0.001

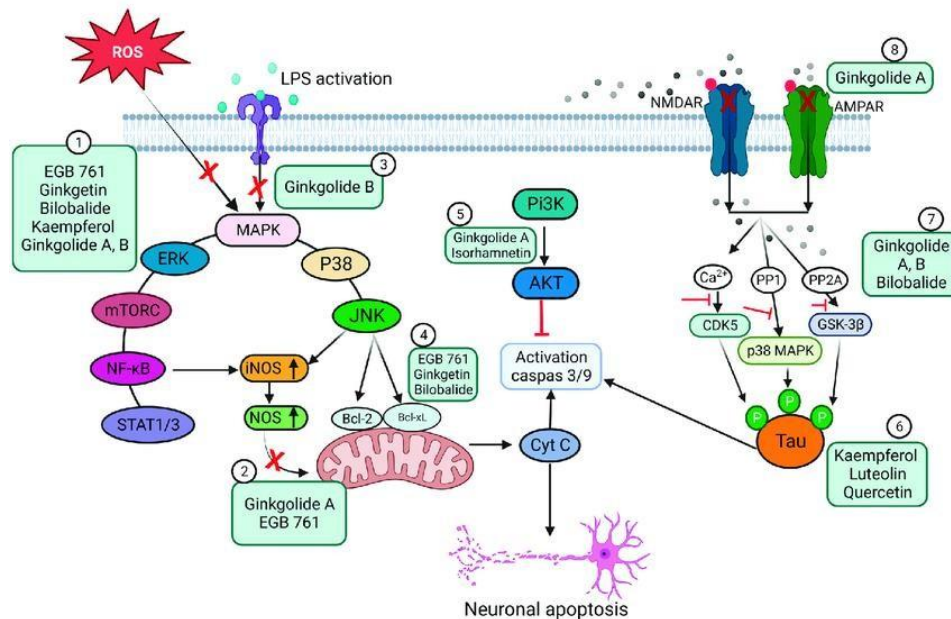
Terapi dengan EGB mampu menghambat kematian RGC pada hewan coba tikus setelah paparan stres oksidatif dengan menggunakan *Hidrogen Peroksida (H₂O₂)* (Cho H. K. et al, 2019). Selain itu, pasien POAG yang diberikan terapi adjuvan dengan 120 mg EGB setiap hari selama 6 bulan menunjukkan tingkat kerusakan *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* rantai tunggal yang lebih rendah pada sirkulasi leukosit sehingga mengurangi kejadian stres oksidatif (Fang L. et al, 2015).

Beberapa studi menunjukkan EGB menghambat progresifitas defek lapang pandang serta meningkatkan fungsi visual pada pasien NTG (Lee J. et al, 2013, Shim S. H. et al, 2012). Berdasarkan hipotesis vaskular pada patogenesis glaukoma, 80 mg EGB yang diberikan 2 kali sehari selama 4 minggu pada pasien NTG menunjukkan peningkatan perfusi yang signifikan dibandingkan kelompok placebo (Park J. W. et al, 2011). Selain itu, 120 mg EGB yang diberikan setiap hari selama 4 minggu dapat meningkatkan kepadatan pembuluh darah kapiler peripapil pada subjek yang sehat (Sabaner M. C. et al, 2021).

Studi yang dilakukan pada hewan coba tikus dengan memberikan suntikan EGB secara intraperitoneal setelah terjadi kerusakan nervus optik menunjukkan tingkat kelangsungan hidup RGC yang lebih tinggi (Cho H. K. et al, 2019, Ma K. et al, 2010). Hal ini disebabkan peran anti-apoptosis GB dengan cara memodulasi jalur sinyal *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) pada tikus dewasa yang mengalami kerusakan nervus optik setelah mendapat *Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection* (DGMI, terbuat dari ekstrak GB termasuk Ginkgolides A, B, dan K) secara injeksi retrobulbar (Fan X. X. et al, 2021). Secara mekanis, DGMI menghambat apoptosis sel dengan menghambat aktivasi P38, JNK, dan *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK 1/2) (Fan X. X. et al, 2021). Selain itu, procyanidin B2 dan rutin yang berasal dari EGB mampu melindungi sel *Retinal Pigment Epithelial* (RPE) yang mengalami stres oksidatif setelah diinduksi *tert-butyl hydroperoxide* dengan memodulasi *Nuclear Factor Erythroid 2-related factor* (Nrf)-2 dan ERK 1/2 (Li Y. et al, 2021). Pada studi lain menunjukkan EGB menghambat P53, Bax, Bcl-2, dan caspase-3/-9 yang dianggap sebagai target inti untuk menghambat apoptosis pada RGC setelah diinduksi H2O2 (Yu H. et al, 2021).

Stres oksidatif dan gangguan sirkulasi mikrovaskular diketahui berhubungan dengan glaukoma, dan terdapat bukti yang mendukung keterlibatan keduanya dalam patogenesis degenerasi optik glaukomatosa. EGB telah menunjukkan potensi dalam melindungi RGC dari degenerasi hipoksia baik secara in vitro maupun in vivo. Hubungan antara stres oksidatif dan gangguan sirkulasi mikrovaskuler terhadap glaukoma yang mengindikasikan potensi EGB dalam mengurangi faktor-faktor ini. Cho

et al meneliti efektifitas EGB 761 pada pengembangan model hewan NTG. EGB berpotensi dalam mengurangi cedera iskemia/reperfusi dan memberikan pengaruh positif terhadap stres oksidatif serta sirkulasi vaskular yang terganggu dengan menghambat ROS dan mensupresi ekspresi mediator proinflamasi (NO) dan sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-6, IL-1 β) melalui jalur signal NF- κ B. Studi lain juga menyebutkan bahwa EGB memblokir ekspresi iNOS dengan mengurangi kadar NO sehingga mencegah terjadinya stres oksidasi pada mitokondria dan menurunkan aktifitas *Peroxynitrite* (*ONOO-*) yang dapat berdifusi secara langsung ke axon retina sehingga menyebabkan apoptosis. EGB 761 mampu mengaktivasi protein anti-apoptosis (Bcl-2 dan Bcl-xl) sehingga mencegah pengeluaran sitokrom C dan kejadian apoptosis. EGB dapat menjadi terapi potensial untuk glaukoma karena sifat neuroprotektif tersebut (Cho H. K. et al, 2019).



Gambar 2.13. Mekanisme aksi GB pada glaukoma dengan cara menghambat efek ROS terhadap jalur MAPK dan memblokir efek peningkatan NOS terhadap mitokondria sehingga mencegah terjadinya apoptosis oleh karena stres oksidatif.

2.6. Buah Merah Papua (*Pandanus conoidenus Lamk.*) sebagai Tanaman Alami Dalam Menghambat Progresivitas Glaukoma

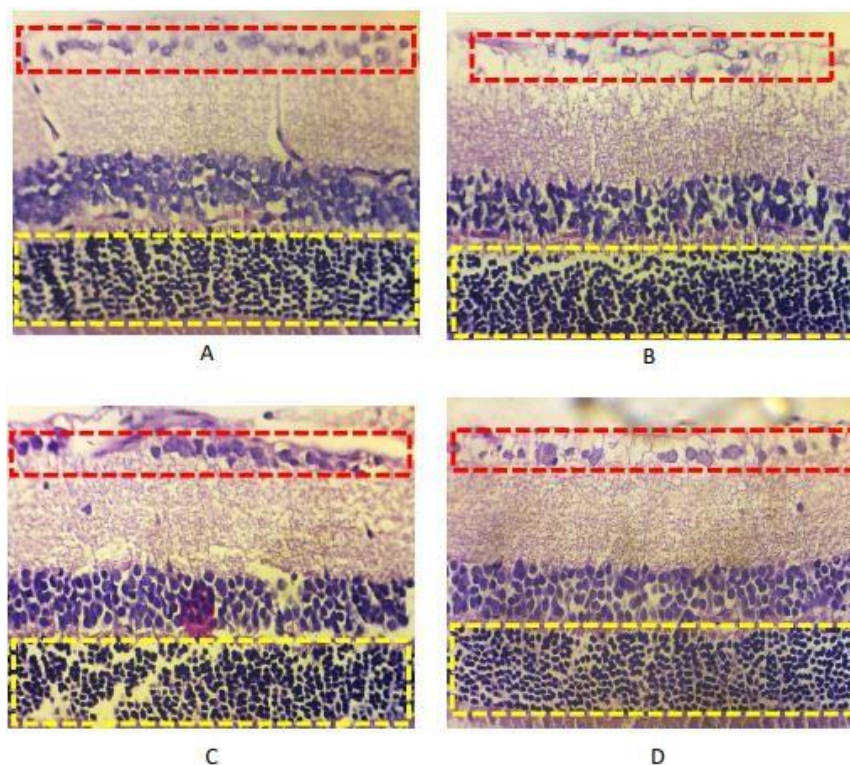
Penyakit degeneratif seringkali disebabkan oleh karena fungsi antioksidan dalam tubuh tidak mampu menetralsir peningkatan konsentrasi radikal bebas. Peningkatan radikal bebas dapat bersifat toksik sehingga merusak inti sel dan menyebabkan penyakit degeneratif. Peran antioksidan diperlukan untuk mencegah terjadinya stres oksidatif dengan menyeimbangkan jumlah radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh (I Made Dira S. et al, 2011). Berbagai kandungan antioksidan dari produk alami di Indonesia dilaporkan cukup banyak dengan senyawa aktif yang berbeda. Penggunaan produk alami Indonesia yang mengandung antioksidan diperlukan untuk meningkatkan kualitas hidup masyarakat (Asri Werdhasari, 2014).

Buah merah merupakan tanaman alami yang saat ini sudah digunakan secara empiris sebagai obat tradisional, pewarna alami, serta sumber nutrisi makanan masyarakat Papua. Ekstrak buah merah telah digunakan oleh masyarakat khususnya di Papua untuk menyembuhkan penyakit degeneratif (I Made Budi et al, 2005). Buah merah paling banyak tumbuh dan ditemukan pada dataran tinggi di daerah pedalaman Papua khususnya pegunungan Jayawijaya. Buah merah menjadi salah satu sumber pangan fungsional masyarakat Papua yang terbukti aman untuk dikonsumsi (Parinussa M. S. T. Dan Rondonuwu, 2009). Kandungan buah merah dipercaya memiliki fungsi antioksidan karena mengandung vitamin C, vitamin E, flavonoid, beta karoten, karotenoid, dan berbagai kandungan lain. Selain itu, buah merah juga mengandung tinggi asam lemak omega-9 dan omega-3 sehingga mudah dicerna dan diabsorpsi (Marlita H., 2008).

Berdasarkan hasil analisa studi yang dilakukan di *Institut Pertanian Bogor (IPB)*, Buah merah memiliki kandungan karotenoid dan alfa tokoferol dalam kadar tinggi yang terbukti perannya sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya stres oksidasi dan penyakit seperti diabetes melitus, hipertensi, kanker, jantung koroner, dan *Human Immuno Virus/Acquired Immuno Deficiency Syndrome (HIV/AIDS)* (Budi I. M.,

2005, Kusmita L. dan Limantara L., 2008). Studi yang dilakukan oleh Susan et al pada hewan coba tikus model diabetik yang diberikan ekstrak buah merah selama 14 hari dengan dosis 1 mL yang setara dengan total karotenoid 12 mg, total tokoferol 10 mg, alfa tokoferol 1,348 mg, dan betakaroten 3,4 mg menunjukkan adanya efek perlindungan pada sel fotoreseptor dan sel ganglion retina dibandingkan kelompok kontrol berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi (Susan W. S. et al, 2024).

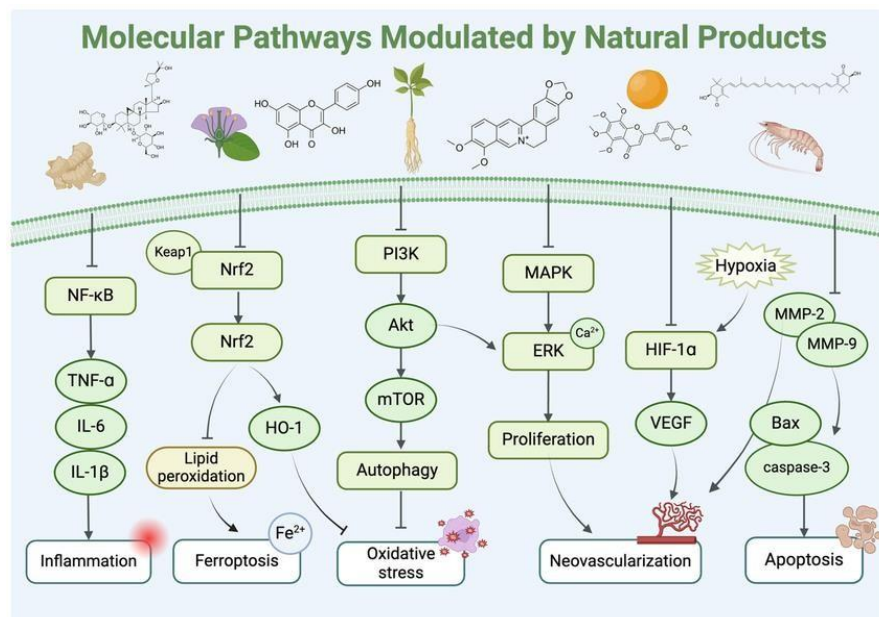
Hal ini diduga bahwa tanaman alami dapat menurunkan kejadian stress oksidatif dengan memblokir jalur *Phosphatidylinositol-13 Kinase (PI3K)*, selain itu juga dapat mengurangi efek inflamasi dengan memblokir jalur NF- κ B sehingga menghambat ekspresi mediator inflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-1 β , serta mencegah terjadinya apoptosis dengan menghambat kerja *Matrix Metallo-Protease (MMP-2 dan MMP-9)* sehingga Bax dan caspase 3 sebagai eksekutor dihambat (Zhao Y. et al, 2024).



Gambar 2.14. Hasil representatif lapisan retina dengan pewarnaan HE. Kelompok A (kontrol normal), B (kontrol diabetik), C (diabetik + EBM 1mL), D (diabetik + EBM 2 mL), garis kuning terputus menunjukkan densitas sel fotoreseptor, garis merah terputus menunjukkan densitas RGC.

Pada studi lain yang dilakukan oleh Ning Xia et al melaporkan bahwa RFO mampu menstimulasi produksi NO dengan menstimulasi eNOS sehingga menyebabkan vasodilatasi dan menurunkan kejadian stress oksidasi di sel endotel yang melibatkan jalur P13K, Akt, dan AMPK (Ning Xia et al,2018).

Beberapa literatur menyebutkan bahwa vitamin E atau alfa tokoferol yang terdapat pada buah merah merupakan kandungan dengan konsentrasi paling tinggi sebagai antioksidan. Hingga saat ini studi terakit peran tokoferol dan tokotrienol yang merupakan klasifikasi dari vitamin E di tingkat seluler masih sangat terbatas (Ranasinghe et al, 2022). Kedua senyawa tersebut memiliki sifat biokimia yang serupa dan mempengaruhi penyerapan dalam tubuh. Kedua senyawa memiliki sifat lipofilik sehingga memfasilitasi penyerapan pada saluran cerna.

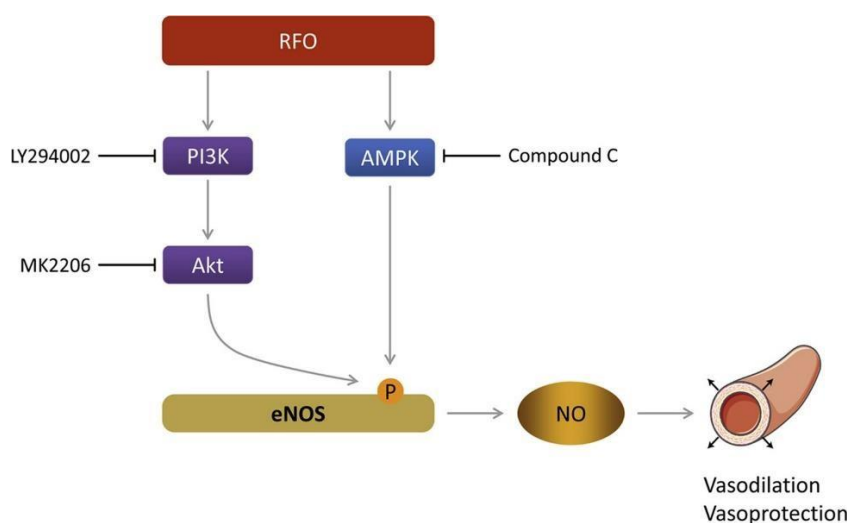


Gambar 2.15. Jalur molekuler yang dimodulasi oleh natural produk terhadap kejadian apoptosis, stres oksidatif, serta inflamasi.

Proses penyerapan juga dimediasi oleh 3 protein diantaranya : *Niemann-Pick C1-like 1 protein (NPC1L1)*, *Scavenger Receptor Class B type 1 (SRB1)*, dan *Cluster of Differentiation 36 (CD36)* (Galmes et al, 2018). Ketiga protein merupakan kolestrol transporter yang dapat mengikat substrat lain. Tokoferol dan tokotrienol diserap dalam usus

sekitar 20 hingga 80% dari jumlah total yang dicerna dan lebih rendah dari vitamin lainnya yang larut dalam lemak (Mohammad, 2023).

Tokoferol dan tokotrienol menunjukkan sifat antioksidan melalui berbagai jalur molekuler. Salah satu mekanisme utamanya melibatkan aktivasi jalur Nrf2 (Ranasinghe et al, 2022). Setelah terpapar senyawa ini, Nrf2 yang merupakan suatu faktor transkripsi akan mendorong ekspresi antioksidan seperti *HemeOxygenase-1 (HO-1)* dan SOD. Peningkatan enzim ini membantu menetralkan ROS dan mengurangi kejadian stress oksidasi dalam sel (Ngo dan Duennwald, 2022). Tokotrienol khususnya terlibat dalam jalur Keap1-ARE yang menyebabkan tokotrienol berinteraksi dengan *Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)* sehingga mengaktifasi *Antioxidant Response Element (ARE)* melalui Nrf2 (Baird dan Yamamoto, 2020). Menurut Ngo dan Duenwald (2022), aktivasi ARE meningkatkan enzim antioksidan yang secara kolektif memperkuat mekanisme pertahanan seluler terhadap kerusakan oksidatif (Ngo dan Duennwald, 2022).

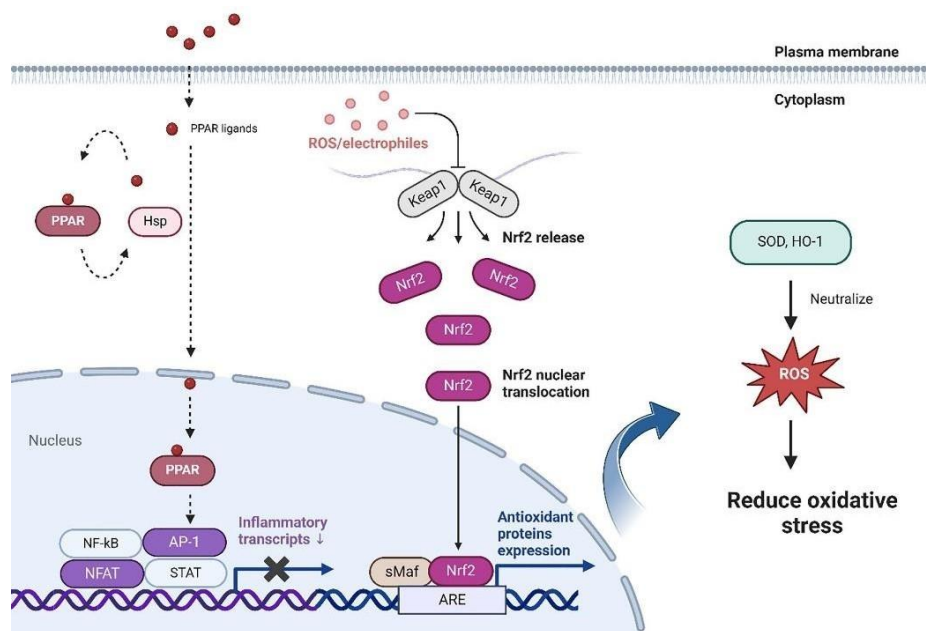


Gambar 2.16. Peran EBM terhadap pembuluh darah melalui jalur AMPK dan P13K yang menghasilkan NO oleh stimulasi *endothelial Nitric Oxide Species (eNOS)* sehingga terjadi vasodilatasi pembuluh darah.

Selain itu, tokotrienol dapat berperan dengan melibatkan *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)* yang merupakan sebuah enzim yang terlibat dalam pengaturan metabolisme lipid, peradangan, dan stress oksidatif (Qureshi, 2022). Aktivasi PPAR oleh

tokotrienol mampu menekan ekspresi gen pro-inflamasi dan memberikan mekanisme pertahanan antioksidan sehingga meningkatkan ketahanan seluler terhadap kerusakan oksidatif (Muzio et al, 2021). Mekanisme yang digunakan tokoferol dan tokotrienol dalam mengatur efek antioksidan melalui jalur molekuler yang rumit dan melibatkan jalur Nrf2, Keap1-ARE, dan aktivasi PPAR (Fazira Latib, 2024)

Studi buah merah telah banyak diteliti pada pasien *Diabetes Melitus (DM)*, diantaranya dalam menurunkan kadar gula darah pada tikus model diabetik dan juga beberapa studi terkait komplikasi DM. Efek sitotoksisitas ekstrak buah merah belum banyak diketahui, namun menurut penelitian yang dilakukan pada tikus coba didapatkan bahwa suplementasi ekstrak buah merah sebanyak 2 mL selama 135 hari tidak menunjukkan efek toksik pada organ hati maupun ginjal (Wuryastuty et al, 2014).



Gambar 2.17. Mekanisme tokoferol dan tokotrienol pada tingkat seluler untuk mengurangi kejadian stres oksidatif yang melibatkan jalur Nrf2, Keap1-ARE, dan aktivasi PPAR.

Studi mengenai karakterisasi dan toksisitas akut pada EBM yang dilakukan pada tikus putih galur wistar dan diberikan dosis tunggal pada 4 kelompok terpisah (5.00 ml/200grbb, 3.75 ml/200grbb, 2.50 ml/200grbb, dan 1.25 ml/200grbb) menunjukkan tidak adanya gejala toksik serta perubahan fisik pada kulit, mata, serta tingkah laku.

Tabel 2.3. Kandungan nutrisi ekstrak minyak buah merah per 100 gram.

Parameter	Hasil	Unit
<u>(Kandungan Kimia)</u>		
Lemak	99.70	g/100g
Protein	< 0.10	g/100g
Karbohidrat	< 0.10	g/100g
Air	0.30	g/100g
Kalori	899	kkal
Kalori	3695	KJ/100g
Parameter	Hasil	Unit
<u>(Asam Lemak)</u>		
Asam lemak tak jenuh	69.70	g/100g
Asam lemak jenuh	9.71	g/100g
Omega-3	0.698	g/100g
Asam lauric	0.040	g/100g
Asam palmitat	17.487	g/100g
Asam palmitoleate	1147	g/100g
Asam oleat	64.416	g/100g
Asam linoleate	9.053	g/100g
Asam arachidic	0.179	g/100g
Asam lignoceric	0.050	g/100g
Parameter	Hasil	Unit
<u>(Vitamin)</u>		
Vitamin A	< 0.0005	mg/100g
Vitamin B1	< 0.010	mg/100g
Vitamin B2	0.024	mg/100g
Vitamin B6	< 0.010	mg/100g
Asam Pantotenik	0.091	mg/100g
Biotin	< 0.0004	mg/100g
Asam folat	< 0.002	mg/100g
Vitamin B12	< 0.0003	mg/100g
Vitamin C	0.140	mg/100g
Vitamin D3	< 0.00005	mg/100g
Vitamin E	5.240	mg/100g
α -Tokoferol	5.110	mg/100g
β -Tokoferol	0.125	mg/100g
γ -Tokoferol	0.204	mg/100g
α -Tokotrienol	0.079	mg/100g
Total karoten	< 0.050	mg/100g
α -Karoten	< 0.010	mg/100g
β -Karoten	< 0.050	mg/100g
Vitamin K1	0.125	mg/100g
Choline	7.500	mg/100g
Inositol	2.340	mg/100g

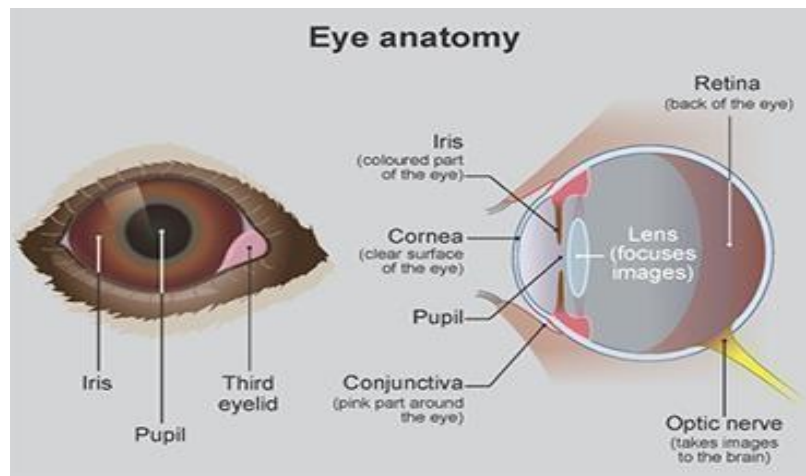
Studi tersebut juga menunjukkan adanya peningkatan berat badan meskipun terjadi fluktuasi hingga hari ke 14. Perbedaan bobot badan pada hewan coba tentunya dipengaruhi oleh hormon sesuai jenis kelamin dimana penyerapan EGB lebih besar pada hewan betina dibandingkan hewan jantan. Diketahui dosis lazim untuk pengobatan pada manusia adalah 30 ml/hari, sehingga bila dosis ini diekstrapolasi ke penggunaan pada tikus menjadi 0.53 ml/200grbb atau sekitar 9.4 kali dosis manusia. Dosis terbesar pada studi ini menggunakan dosis 5 ml/200grbb dan tidak ditemukan adanya kematian hewan coba serta efek toksik yang berarti, sehingga nilai LD₅₀ dinilai sebagai LD₅₀ semu dan diperkirakan LD₅₀ EBM mencapai lebih dari 5 ml/200grbb (Widowati L. et al, 2009).

Hal ini sejalan dengan studi Wismandu et al 2016 yang melakukan uji toksisitas akut dan nilai enzim hati setelah pemberian EBM pada 3 kelompok dengan dosis 300 mg/kgbb, 2000 mg/kgbb, dan 5000 mg/kgbb dosis tunggal kemudian dievaluasi selama 14 hari menunjukkan tidak ada kematian pada hewan coba dan hanya kelompok 5000 mg/kgbb yang didapatkan kejadian diareta setelah 60 menit pemberian. Hal ini juga sejalan dengan nilai enzim hati yang dievaluasi menunjukkan tidak ada peningkatan signifikan setelah pemberian EBM dosis maksimal pada studi tersebut. Dari studi diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa EBM relatif cukup aman dikonsumsi dengan nilai LD₅₀ lebih dari 5000 mg/kgbb atau termasuk kategori 5 *Globally Harmonized System for Chemical Classification Substances and Mixtures (GHS)* yang dinilai sebagai material non toksik (Wismandanu O. et al, 2016).

2.7. Kelinci (*Oryctolagus Cuniculi*)

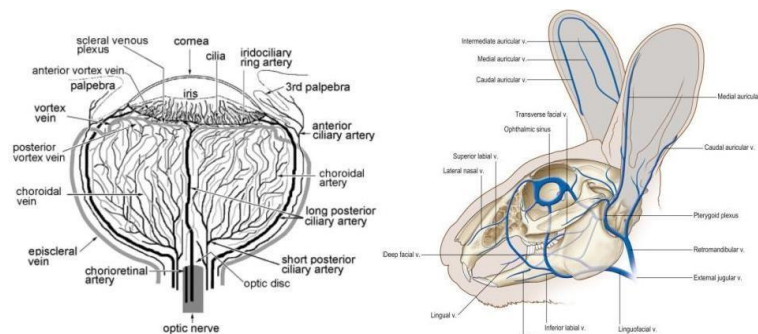
Kelinci *Oryctolagus Cuniculi* termasuk dalam ordo *Lagomorpha* dan merupakan keturunan kelinci Eropa yang dilengkapi sepasang gigi seri kecil dibagian atas. Kelinci ini hanya memakan tumbuh-tumbuhan dan aktif pada malam hari (Harcourt Brown, 2002). Kelinci memiliki mata dengan ukuran yang relatif besar dan terletak disisi kepala dengan kornea yang menempati 25% bola mata sehingga mempunyai lapang pandang yang luas hampir 360 derajat. Kelinci memiliki akomodasi yang buruk namun memiliki lensa yang besar dan bulat serta badan siliaris yang kurang berkembang. Kelinci

memiliki kelopak mata atas yang lebih tebal dan pendek dibanding bagian bawah dan uniknya hanya berkedip 10 - 12 kali per jam (Harcourt Brown, 2002).



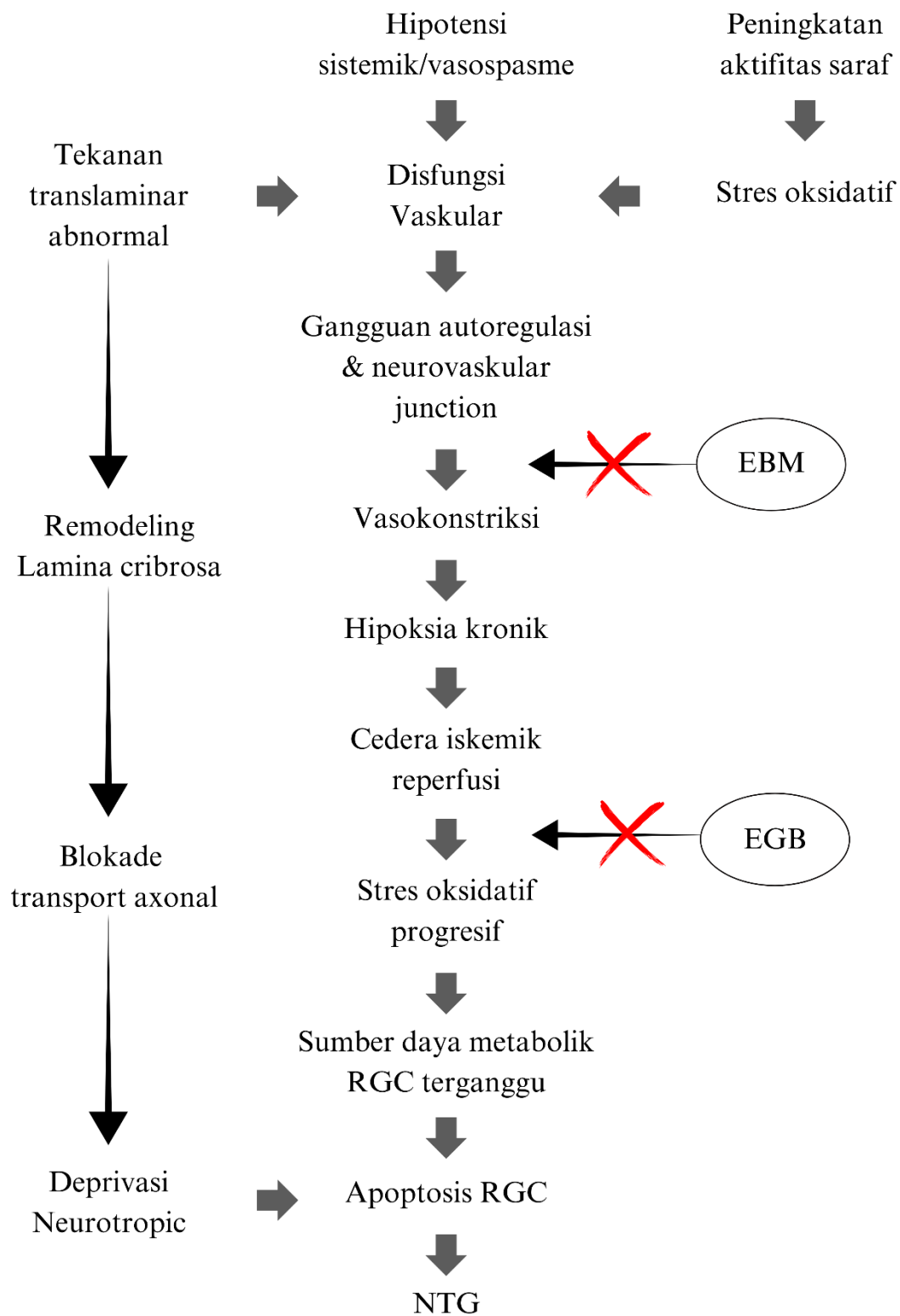
Gambar 2.18. Anatomi bola mata kelinci.

Dalam kebanyakan kasus, pembesaran mata disebabkan oleh glaukoma. Tonometri dapat digunakan untuk evaluasi tekanan bolamata pada kelinci. Tekanan bola mata normal pada kelinci berkisar antara 15-23 mmHg. Pemeriksaan funduskopi pada kelinci membutuhkan pupil yang lebar. Nervus optik terletak diatas garis horizontal sehingga penting untuk melihat kearah atas menggunakan oftalmoskop untuk melihat diskus optik yang memiliki cekungan alami yang dalam. 40% kelinci dilaporkan mampu menghasilkan atropinesterasi yang mampu menghambat kerja atropin sehingga tropicamide bisa menjadi alternatif lain dalam upaya melebarkan pupil. Selain itu, kelinci memiliki pleksus vena orbital retrobulbar yang relatif besar sehingga ketika dilakukan enukleasi maka pleksus vena harus diikat untuk meminimalisir perdarahan (Harcourt Brown, 2002).

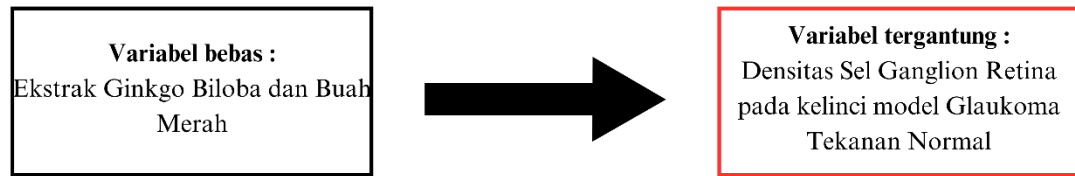


Gambar 2.19. Distribusi pembuluh darah kelinci pada area mata, kepala, serta telinga.

2.8. Kerangka Teori



2.9. Kerangka Konsep



Keterangan :

Variabel bebas :

Variabel tergantung :

mempengaruhi atau diteliti : 

2.10. Hipotesis

- H0 : Tidak terdapat efek proteksi terhadap sel ganglion retina yang diberikan ekstrak ginkgo biloba dan buah merah pada kelinci model NTG.
- H1 : Terdapat efek proteksi terhadap sel ganglion retina yang diberikan ekstrak ginkgo biloba dan buah merah pada kelinci model NTG.