

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Glaukoma merupakan sindrom ditandai dengan adanya neuropati optik yang bersifat progresif akibat adanya kematian sel ganglion retina dan akson-aksonnya yang berhubungan dengan perubahan morfologis pada nervus optikus dan lapisan serabut saraf retina (*retinal nerve fiber layer/ RNFL*).¹ Kejadian glaukoma secara global diperkirakan mencapai angka 76 juta di tahun 2020 dan 111,8 juta di tahun 2040. Sedangkan menurut survei *Rapid Assesment of Avoidable Blindness (RAAB)* di Indonesia yang dilakukan di 15 provinsi pada tahun 2014-2016, penyebab kebutaan oleh karena glaukoma sebesar 2,5%.^{2,3,4}

Glaukoma merupakan penyebab utama kebutaan permanen di dunia, terutama *primary open-angle glaukoma (POAG)*. Sebesar 50% dari sel ganglion retina rusak sebelum defisit fungsional. Tekanan intra okular (TIO) tinggi dianggap sebagai faktor risiko utama untuk glaukoma. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa glaukoma dapat berkembang bahkan dengan tingkat TIO normal. Studi terbaru menunjukkan bahwa penurunan TIO tidak selalu mencegah hilangnya sel ganglion retina dan neuropati optik.⁵

Pada glaukoma terjadi degenerasi *transsynaptic* yang menunjukkan bahwa terjadi kerusakan aksonal yang meluas dari saraf optik ke jalur visual di otak. Faktor seluler yang dipengaruhi oleh stres oksidatif dan iskemik dipercaya mengambil peran penting dalam kerusakan sel ganglion retina. Jaringan iskemik akan berespon dengan melepaskan glutamat. Asam amino glutamat merupakan neurotransmitter penting dalam retina. Konsentrasi glutamat yang tinggi bersifat toksik bagi neuron serta akan mengaktivasi reseptor glutamat ionotropik (*N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)*) sehingga menyebabkan kerusakan saraf secara eksitotoksik.⁶ Eksitotoksitas yang dimediasi oleh NMDA merupakan jalur utama dan dapat dianggap sebagai salah satu target strategi anti apoptosis. Eksitotoksitas yang ditimbulkan NMDA menggambarkan pathogenesis faktor vaskular kerusakan sel ganglion retina yaitu glaukoma tanpa adanya peningkatan

tekanan intraokular.⁵ Injeksi intravitreal NMDA menyebabkan aktivasi *caspase-3*, kerusakan deoxyribonucleic acid (DNA), perubahan struktural, apoptosis sel ganglion retina yang terdeteksi pada pemeriksaan *immunostaining*, dan merusak sel ganglion retina sehingga mengalami penipisan sel dan pengurangan jumlah sel.⁷

Aktivasi reseptor NMDA menyebabkan terbukanya saluran ion di neuron sehingga kalsium dan natrium ekstraseluler masuk. Toksisitas neuronal yang dimediasi glutamat bergantung pada masuknya kalsium ekstraseluler, dan nantinya akan mengaktifkan kaskade eksitotoksik sehingga menyebabkan kematian sel saraf. Kalsium merupakan kation penting yang biasanya diserap oleh mitokondria, retikulum endoplasma dan sejumlah protein pengikat kalsium. Kandungan kalsium yang tinggi bersifat toksik bagi sel.⁶

Proses apoptosis itu sendiri menghasilkan ROS (*reactive oxygen species*) melalui jalur langsung apoptosis.⁸ Terdapat banyak faktor pemicu apoptosis, baik faktor ekstraseluler maupun intraseluler. Termasuk kekurangan faktor neurotropik atau kerusakan oksidatif, yang keduanya telah diasumsikan menginduksi apoptosis sel ganglion retina pada glaukoma. Sejumlah penyakit patogen termasuk iskemia dan eksitotoksisitas telah dikaitkan dengan peningkatan kadar nitrit oksida (NO) di retina. Nitrit oksida memiliki kemampuan untuk berpindah tempat dari satu neuron ke neuron lain melewati sinaps menyebabkan pembentukan radikal bebas yang kemudian kematian sel ganglion retina. Radikal bebas mengganggu keutuhan seluler makromolekul sel dan selanjutnya menyebabkan gangguan pemecahan protein, peroksidasi lipid dan degenerasi asam nukleat, yang mengakibatkan penghancuran sel.⁶

Aktivitas *caspase-3* meningkat secara signifikan pada kultur yang diinjeksi dengan NMDA pada 12 dan 24 jam bila dibandingkan dengan kultur kontrol. Jalur apoptosis dan autophagy terjalin secara rumit di dalam sel. Dalam percobaan Sadasivan et al., mengemukakan dua hal yaitu yang pertama aktivasi enzim *caspase-3* yang diinduksi NMDA dan pemecahan spektrin sensitif terhadap 3-MA, pengamatan ini menunjukkan bahwa apoptosis dan *caspase-3* dapat saling terkait.⁹ Pada penelitian Polat dkk, penelitian mengenai efek molsidomine pada

retina *induced* iskemi/ gangguan perfusi pada retina didapatkan bahwa terjadi peningkatan secara signifikan ekspresi caspase-3 di *inner plexiform layer* pada kelompok 2 (tikus model iskemia) dibanding dengan kelompok lainnya (kelompok 1 merupakan kontrol ; kelompok 3 merupakan kelompok tikus model iskemia dengan perlakuan molsidomine selama 4 hari; dan kelompok 4 merupakan kelompok perlakuan molsidomine selama 1 hari sebelum induksi iskemia dan 3 hari pada tikus model iskemia).^{9,10}

Caspase merupakan keluarga protease sistein yang memiliki residu sistein yang dikonservasi di situs aktifnya dan membelah setelah residu aspartat di substratnya. Sebagai enzim proteolitik kunci yang terlibat dalam kematian sel terprogram (atau apoptosis) baik pada jalur intrinsik maupun ekstrinsik, *caspase* ditemukan pada berbagai hewan dari cacing hingga manusia; pada mamalia, 12 *caspase* telah diidentifikasi.¹¹ *Caspase* merupakan protease sistein aspartat yang dapat dibagi menjadi dua subfamili filogenik utama, baik interleukin (IL)-1 β -converting enzyme (inflamasi) atau *mammalian counterparts* dari *caspase* CED-3 (apoptosis). *Caspase* juga sebagai komponen utama dari kaskade pensinyalan apoptosis, meskipun mereka juga memiliki peran non-apoptosis lainnya, termasuk peradangan. *Caspase* diaktifkan oleh dimerisasi yang diinduksi oleh kompleks protein, *feedback loops* dan pembelahan pro-enzim. *Caspase* diklasifikasikan menjadi dua yaitu *caspase* inisiator (*caspase* 1,2,4,5,8,9,10,11, dan 12), sedangkan *caspase* efektor (*caspase* 3,6,7, dan 14). *Caspase*-3 merupakan agen pro apoptotik yang berperan sebagai *caspase* efektor utama (eksekutor) dalam mekanisme apoptosis serta mempengaruhi *caspase* efektor lain.¹²

Suplementasi nutrisi dengan sifat antioksidan, anti inflamasi dan anti apoptosis sangat penting sebagai pelengkap untuk pengobatan glaukoma yang berguna untuk mencegah kematian sel lebih lanjut.¹¹ Vitamin D merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan prohormon yang memiliki fungsi utama mengatur keseimbangan kalsium tubuh.¹³ Dua bentuk utama vitamin D adalah vitamin D2 (ergocalciferol) dan vitamin D3 (cholecalciferol). Vitamin D3 adalah satu-satunya bentuk vitamin D yang ditemukan secara alami pada manusia dan hewan.¹³ Annweiler dkk (2013) menyebutkan bahwa vitamin D merupakan

hormon neuroprotektif neurosteroid dengan sifat antioksidan, anti inflamasi dan anti iskemik.¹⁴ Metabolit aktif dari Vitamin D, 1,25 (OH) 2 D3, mencegah peningkatan Ca^{2+} melalui P2X7 channel. Pemberian suplementasi vitamin 1,25 (OH) 2 D3 mengurangi masuknya Ca^{2+} melalui P2X7 channel. Pemberian suplementasi vitamin D3, serum konsentrasi 25 (OH) D3 meningkat dan *free cytosolic calcium concentration* menurun.¹⁵ Pada penelitian Alsalem dkk., yang menguji ekspresi Vitamin D3 pada sel epitel barrier okular, menunjukkan adanya ekspresi reseptor vitamin D (VDR) pada *primary human scleral fibroblasts* (HSF), *human corneal endothelial* (HCEC-12), *nonpigmented ciliary body epithelial* (ODM-2), dan *adult retinal pigment epithelial* (ARPE-19).¹⁶

Vitamin D dapat membantu mencegah peradangan dan iskemia pada neuropati optik. Hipovitaminosis D terkait usia dapat menyebabkan degenerasi saraf optik dan atrofi sel ganglion retina di kiasma optik.^{15,17} Vitamin D dipercaya dapat menurunkan aktivasi *nitric oxide synthase* (NOS) dan menurunkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS).^{17,18} Penelitian Parisi dkk (2010) meneliti aktivasi NMDA reseptor secara terus-menerus pada ginjal, sehingga terjadi penurunan sintesis 1,25 (OH) 2D3 yang merupakan bentuk biologis aktif vitamin D di ginjal. Aktivasi NMDAR secara terus-menerus pada ginjal menyebabkan peningkatan sintesis dan pelepasan PTH karena penurunan sintesis dan aktivitas 1α -hidroksilase melalui aktivasi MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) dan penurunan sintesis 1,25 (OH) 2D3.¹⁹

Penelitian Lam dkk (2015) mengenai peran neuroprotektif vitamin D pada *parathyroid hormone axis* sebagai pertimbangan dalam terapi penyakit neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer, *multiple sclerosis*, epilepsi maupun stroke pada hewan uji mencit menunjukkan bahwa pemberian vitamin D eksogen meningkatkan *parenchymal abundance of glial-fibrillary acidic protein* (GFAP) (marker aktivasi astroglial).²⁰ Penelitian Lima dkk (2018) mengenai peran neuroprotektif Vitamin D terhadap nervus dopaminergik melawan neuroinflamasi dan stres oksidatif pada tikus hemiparkinson, menunjukkan bahwa pre maupun pasca perawatan dengan VD3 mengembalikan perubahan perilaku, mengurangi stres oksidatif, meningkatkan *tyrosine hydroxylase* (TH) dan *dopamine*

transporter (DAT), dan mengurangi *immunostaining* TNF- α pada striata yang mengalami lesi.²¹

Sebuah penelitian menunjukkan bahwa prevalensi defisiensi vitamin D lebih tinggi di antara pasien dengan penyakit Parkinson. Newmark dkk menyimpulkan bahwa kekurangan vitamin D kronis kemungkinan terkait dengan patogenesis atau perkembangan penyakit Parkinson. Hipotesis ini juga didukung oleh penelitian prospektif selama 29 tahun di Finlandia, yang menegaskan bahwa mereka yang memiliki konsentrasi vitamin D yang lebih tinggi lebih kecil kemungkinannya untuk terkena penyakit Parkinson.²²

Tikus Wistar sering digunakan sebagai salah satu hewan coba pada penelitian model glaukoma. Mata tikus Wistar memiliki struktur anatomi dan fungsi yang mirip dengan manusia. Hewan uji tikus juga baik dalam menunjukkan onset dan perjalanan penyakit. Tikus memiliki siklus hidup yang pendek sekitar dua tahun, sehingga progresi perjalanan penyakit relatif cepat sehingga memudahkan dalam pengamatan mengenai munculnya manifestasi penyakit yang diinduksi ke tikus terhadap mata manusia.^{23,24,25}

Pencegahan neurotoksisitas sebagai salah satu strategi yang digunakan untuk mengurangi kerusakan saraf pada sistem saraf pusat (SSP) yang disebabkan oleh serangan stroke iskemik, trauma atau karena penyakit neuro degeneratif seperti glaukoma. Tujuan dari pencegahan neurotoksisitas adalah membatasi daerah yang rusak.^{26,27}

Penelitian mengenai vitamin D3 oral dalam mekanisme sebagai pencegahan neurotoksisitas, anti oksidatif dan anti inflamasi masih terbatas khususnya pada bidang glaukoma.^{28,29} Penelitian mengenai efek vitamin D3 oral terhadap ekspresi *caspase-3* hingga saat ini belum ada. Oleh sebab itu, peneliti mengajukan rancangan penelitian untuk menguji pengaruh vitamin D3 terhadap ekspresi *caspase-3* pada tikus model glaukoma dengan induksi NMDA.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah ekspresi *caspase-3* lebih rendah pada tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA yang diberi Vitamin D3 daripada kontrol?

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ekspresi *caspase-3* lebih rendah pada tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA yang diberi Vitamin D3 daripada kontrol

I.3.2 Tujuan Khusus

1. Mendapatkan data ekspresi *caspase-3* di sel ganglion retina tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA dan diberi vitamin D3.
2. Mendapatkan data ekspresi *caspase-3* di sel ganglion retina pada tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA tanpa vitamin D3.
3. Membandingkan dan menganalisis ekspresi *caspase-3* di sel ganglion retina pada tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA yang diberikan vitamin D3 dan tanpa vitamin D3.

I.4 Manfaat Penelitian

I.4.1 Manfaat bagi Ilmu Pengetahuan dan Penelitian

1. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan data ilmiah mengenai pengaruh vitamin D3 terhadap ekspresi *caspase-3* di sel ganglion retina pada tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA.
2. Memberikan landasan ilmiah untuk penelitian selanjutnya tentang pengembangan dan pemanfaatan vitamin D3 untuk manusia di bidang Ilmu Kesehatan Mata.

I.4.2 Manfaat bagi Klinisi

Memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat vitamin D3 terhadap ekspresi *caspase-3* di sel ganglion retina sebagai obat pendamping anti glaukoma.

I.4.3 Manfaat bagi Masyarakat

Memberikan informasi mengenai potensi pemberian vitamin

D3 terhadap kesehatan saraf mata.

I.5 Orisinalitas Penelitian

Upaya penelusuran pustaka telah dilakukan penulis dan tidak dijumpai adanya penelitian atau publikasi sebelumnya yang dapat menjawab permasalahan penelitian.

Tabel 1.1 Penelitian sebelumnya yang berhubungan dengan penelitian ini

No.	Peneliti, Judul Penelitian, Nama Jurnal, Tahun Terbit	Desain Penelitian, Subjek Penelitian	Hasil Penelitian
1.	Parisi <i>et al.</i> , <i>Sustained activation of renal N-methyl-D-aspartate receptors decrease vitamin D synthesis</i> , AJP-Endocrinol Metab, 2010. ¹⁹	Studi eksperimental pada tikus <i>Sprague-Dawley</i> , menggunakan sampel darah dan sampel urin, diperiksa menggunakan kultur, PCR dan western blot.	Aktivasi NMDAR secara terus-menerus pada ginjal menyebabkan peningkatan sintesis dan pelepasan PTH karena penurunan sintesis dan aktivitas 1α -hidroksilase melalui aktivasi MAPK (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>) dan penurunan sintesis 1,25 (OH) 2D3
2.	Sánchez-Migallón <i>et al.</i> , <i>Apoptotic Retinal Ganglion Cell Death After Optic Nerve Transection or Crush in Mice: Delayed RGC Loss with BDNF or a Caspase 3 Inhibitor</i> , Investigate Ophthalmology & Visual	Studi eksperimental pada tikus swiss albino, Saraf optik mata kiri dirusak pada 0.5 mm dari papil N.II dan dianalisis 1 sampai 10 hari. Kelompok lainnya di injeksi intravitreal dengan BDNF atau <i>Z-DEVD_fmk</i> kemudian Brn3a (RGCs) dan <i>cleaved-caspase 3</i> (<i>c-casp3</i>) dinilai dengan intensitas fluorescence menggunakan <i>Image J software</i> .	<i>Down regulation</i> Brn3a menandai awal kematian RGC (<i>retinal ganglion cell</i>), yang setelah axotomy terjadi oleh apoptosis yang bergantung pada <i>caspase</i> di setidaknya setengah dari RGC.

Science Journal, 2016. ³⁰	Untuk melihat sel ganglion retina yang bertahan dan aktivasi <i>caspase 3</i> setelah <i>optic nerve crush</i> (ONC) atau <i>optic nerve transection</i> (ONT) dan pengobatan dengan <i>brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF) atau <i>Z-DEVD_fmk</i> .	
3. Lee <i>et al.</i> , <i>Vitamin D Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Injury by Reducing Mitochondrial Fission and Mitophagy</i> , <i>Frontiers in Pharmacology Research</i> . 2020. <small>31</small>	Studi eksperimental pada tikus C57BL/6 model hipoksia dibuat dalam sel H9c2 untuk mensimulasikan cedera iskemia miokard dan diberi suplementasi vitamin D3. Imunohistokimia <i>westernblot</i> digunakan untuk mengukur <i>caspase 3</i> , Bcl-2 dan LC3BII/I .	Kondisi hipoksia/ <i>reperfusion injury</i> secara signifikan mengurangi viabilitas sel H9c2 menyebabkan terjadinya apoptosis terjadi peningkatan ekspresi <i>caspase-3</i> , ekspresi BCL-2 dan <i>light chain</i> (LC2BII-I) Pemberian suplementasi vitamin D3 memberikan efek kardioprotektif terhadap cedera kondisi iskemik dengan melindungi integritas struktural dan fungsional mitokondria serta mengurangi apoptosis.
4. Tecilazich <i>et al.</i> , <i>Role of vitamin D in diabetic retinopathy: Pathophysiological and clinical aspects</i> , <i>Rev Endocr Metab Disor</i> , 2020. ¹⁷	Sistematik review, defisiensi Vitamin D terlibat dalam perkembangan dan progresi retinopati diabetik.	Vitamin D meningkatkan produksi NO yang bergantung pada eNOS; mengurangi stres oksidatif; meningkatkan sintesis dan pelepasan <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF); memodulasi inflamasi dan sistem kekebalan; mengurangi transformasi produksi faktor pertumbuhan- β

			(TGF- β); mengatur aktivasi <i>complement cascade</i> ; menghambat sistem renin-angiotensin aldosteron (RAAS); mengurangi efek merugikan dari produk akhir glikasi lanjutan (AGEs); mengurangi stres retikulum endoplasma (ER); mengatur apoptosis sel endotel.
5.	Bao <i>et al.</i> , <i>Vitamin D Alleviates Cognitive Dysfunction by Activating the VDR/ERK1/2 Signaling Pathway in an Alzheimer's Disease Mouse Model</i> , Neuroimmunomodulation, 2021. ³²	Studi eksperimental pada 40 mencit APPswe/PS1 Δ E9 (20 mencit kelompok model <i>Alzheimer Disease/ AD</i> , 20 mencit kelompok model Vit D + AD) dan 40 mencit C57BL/6J (20 kelompok kontrol, 20 mencit kelompok model Vit D dan kontrol). Kelompok Vit D + AD dan kelompok Vit D dan kontrol di injeksi Calcitriol (100 ng/kg) secara intraperitoneal 1x/hari selama 6 minggu. Pewarnaan hematoxylin dan eosin digunakan untuk mengevaluasi perubahan morfologi pada neuron hipocampus. <i>Western blotting</i> digunakan untuk mengevaluasi protein <i>caspase-3</i> , Bax, Bcl-2, VDR dan p-ERK.	Vitamin D meningkatkan kemampuan belajar dan memori dan defek morfologis pada neuron hipocampus. Vitamin D menurunkan ekspresi gen <i>caspase-3</i> dan Bax dan meningkatkan ekspresi Bcl-2. Vitamin D dapat memberikan efek neuroprotektif pada model tikus AD.

Penelitian ini akan menilai pengaruh vitamin D3 terhadap ekspresi *caspase-3* sel ganglion retina pada tikus Wistar dengan induksi NMDA. Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental, dimana akan meneliti dan menilai ekspresi *caspase-3* sel ganglion retina dengan dan tanpa vitamin D3, serta membandingkan data ekspresi *caspase-3* sel ganglion retina antara yang diberikan vitamin D3 dengan yang tidak pada tikus Wistar model glaukoma dengan induksi NMDA.

Penelitian yang mengkaji efek pencegahan dan perlindungan sekunder terhadap neurotoksisitas, efek antioksidatif serta antiinflamasi vitamin D3 masih terbatas khususnya pada bidang glaukoma. Oleh sebab itu rancangan penelitian ini diajukan untuk menguji potensi vitamin D3 terhadap glaukoma akibat kerusakan sel ganglion retina pada tikus model glaukoma.

Penelitian ini menggunakan desain studi eksperimental dengan rancangan *post-test only randomized controlled group design*. Penelitian ini akan mengamati dan menganalisis pengaruh vitamin D3 terhadap ekspresi *caspase-3* sel ganglion retina tikus Wistar dengan induksi NMDA pada kelompok yang diberi vitamin D3 dengan dosis 500mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok plasebo.