

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam mikroorganisme penyebab terbanyak keratitis infeksius parah yang sering berakhir dengan kebutaan. Infeksi pada kornea menyebabkan kerusakan jaringan permanen serta jaringan parut kornea. Struktur *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan faktor-faktor virulensi antara lain lipopolysaccharide, flagella, adesin, dan pili pada permukaan bakteri. *Pseudomonas aeruginosa* mensekresi sejumlah toksin yang mengganggu sintesis protein dan merusak membran sel pada kornea, seperti protease yang mendegradasi matriks ekstraselular stroma kornea (Burns *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 2001; Cantor *et al.*, 2014; Alhazmi, 2015). Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada mata merupakan kondisi yang mengancam penglihatan, onsetnya cepat dan menyebabkan peradangan stroma kornea secara progresif (Canto *et al.*, 2014). Keratitis yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* cepat menimbulkan infiltrasi supuratif, selanjutnya terjadi pembuburan dan perforasi kornea yang akhirnya menyebabkan kebutaan (Cantor *et al.*, 2014; Oka *et al.*, 2015).

Sel epitel kornea berperan penting sebagai “barrier” terhadap stimulus dari luar, dan jika terdapat defek pada epitel kornea, bakteri termasuk *Pseudomonas aeruginosa* dapat menginfeksi kornea dan menyebabkan peradangan/ keratitis yang parah. *Pseudomonas aeruginosa* memerlukan defek pada epitel untuk menginfeksi kornea, dan sampai saat ini belum diketahui mekanisme kematian sel epitel kornea yang jelas oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* sebagai penyebab keratitis yang mengancam penglihatan. Keratitis bakterial sering berhubungan dengan faktor resiko

yang mengganggu integritas kornea, antara lain pada pemakai lensa kontak, trauma kornea, kontaminasi obat mata, gangguan mekanisme imunitas, perubahan struktur permukaan (Cantor *et al.*, 2014). Keratitis yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dapat terjadi setelah trauma, operasi mata dan pada pemakai lensa kontak (Mochizuki *et al.*, 2014).

Insiden keratitis infeksius di Amerika didapatkan 11 kasus per 100.000 penduduk, pada negara berkembang mencapai 799 kasus per 100.000 penduduk pertahun di Nepal (Farias *et al.*, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* menjadi penyebab keratitis bakterial sebesar 6-39% kasus di Amerika, dan 8-21% di India Selatan (Srinivasan *et al.*, 2012). Sebanyak 25% (dari 220 kasus) keratitis oleh karena *Pseudomonas aeruginosa* selama 4 tahun ditemukan di RS Cipto Mangunkusumo, Jakarta (Asrorudin *et al.*, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* menjadi penyebab keratitis bakterial terbanyak kedua di RSUD Dr. Soetomo Surabaya (Triyono, 2016), juga didapatkan 108 pasien keratitis oleh karena bakteri selama tahun 2017-2018 di rumah sakit yang sama dengan 53% hasil kultur positif dan 26% merupakan *Pseudomonas aeruginosa* (Tunggadewi, 2018). Keratitis oleh karena *Pseudomonas aeruginosa* yang sensitif terhadap obatpun menyebabkan perforasi kornea pada 12% kasus di India (Vazirani *et al.*, 2015).

Pseudomonas aeruginosa merupakan spesies yang paling penting pada manusia dan bertanggungjawab terhadap infeksi yang serius diantara semua spesies *Pseudomonas*, merupakan patogen oportunistik yang memerlukan defek pada kornea untuk memulai terjadinya infeksi (Alhazmi, 2015). Patogenesis *Pseudomonas aeruginosa* melalui banyak faktor-faktor virulensi yang memfasilitasi adesi serta gangguan pada jalur sinyal sel inang ketika menuju matriks ekstraseluler (Pier dan Rampal, 2005). Faktor-faktor virulensi tersebut berperan penting pada awal

perpindahan secara cepat serta adesi terhadap epitel diduga menjadi titik kritis virulensi yang maksimal dari *Pseudomonas aeruginosa* (Preston *et al.*, 1995). Tanda klasik peradangan pada kornea tikus yang terinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* yaitu adanya lekosit *polymorphonuclear* dan edema kornea yang berat. Bakteri melewati *intercellular junctional complexes*, dan terdapat diantara dua sel epitel yang berdekatan. Sel epitel yang mengalami penetrasi sebagian besar sel basal dekat lamina basalis. *Pseudomonas aeruginosa* yang masuk ke dalam sel epitel terdapat di dalam membran vakuol diduga merupakan patogen oportunistik yang memerlukan defek pada kornea untuk memulai terjadinya infeksi melalui proses endositosis. Lapisan epitel kornea sentral yang terinfeksi hilang dalam waktu 24 jam tetapi epitel kornea perifer masih intak. Setelah 24 jam sebagian besar bakteri tidak berada di dalam membran vakuol, diduga *Pseudomonas aeruginosa* dapat keluar dari vakuol endositik (Fleiszig *et al.*, 1994).

Beberapa faktor virulensi yang diduga kuat dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* antara lain: *lipopolysaccharida* yang merupakan komponen dominan membran luar bakteri terdiri atas lipid A (endotoksin), berperan penting pada aktivasi respon imun bawaan (TLR4) dan didapat (Heine, 2001). LPS dikenali oleh TLR4-MD2-CD14 kompleks yang terdapat pada beberapa tipe sel (Poltorak *et al.*, 1998). TLR4 selanjutnya berinteraksi dengan MyD 88 yang merupakan protein adaptor sampai terjadinya fosforilasi kompleks IKK termasuk IKK β dan menyebabkan terbentuknya jalur sinyal intraselular NF- κ B dan produksi sitokin inflamatori antara lain TNF α dan IL-8 (Feghali dan Timothy, 1997). Ikatan oleh *death receptors* ,seperti TNFR1 meningkatkan rekrutmen dan keutuhan protein RIPK1 terhadap adaptor TRADD (Newton, 2015). Selanjutnya dapat terjadi fosforilasi RIPK1 dan RIPK3 yang menyebabkan perekrutan MLKL yang diikuti perubahan struktur membran plasma dan

akhirnya ruptur, diakhiri dengan kematian sel yang disebut nekroptosis. Aktifasi TLR 4 juga dapat merekrut adaptor protein sitoplasma TRIF yang dapat langsung dan mengaktifasi RIPK3 dan selanjutnya menginduksi nekroptosis (Chen *et al.*, 2018). Kearney *et al.* (2015) melaporkan bahwa LPS intraperitoneal juga meningkatkan nekroptosis melalui inhibisi *caspase* pada hewan coba tikus.

Flagella bertanggung jawab terhadap gerakan *swimming* yang terdapat pada salah satu kutub bakteri. Protein flagella (flagellin) berperan penting untuk perlekatan, invasi, pembentukan biofilm dan mediator respon peradangan (Campodonico *et al.*, 2010). Flagellin merupakan mediator terhadap respon peradangan melalui sistem imun bawaan yaitu interaksi spesifik dengan sejumlah *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) inang (Verma *et al.*, 2005). Selama infeksi, bakteri melekat pada epitel inang melalui perlekatan antara flagellum terhadap *asialyated glycolipid asialo-GM 1* dan dapat mendatangkan NFkB melalui sinyal TLR5 (Miao *et al.*, 2008). Flagellin dikenal oleh TLR5, aktivasi TLR5 melalui adaptor protein MyD 88 membuka jalur intraseluler NF-kB seperti pada TLR4 yang menghasilkan sitokin IL-8 dan TNF α dengan sistem autokrin diikat oleh TNFR1 sel epitel (Hayashi *et al.*, 2001). TNFR1 selanjutnya mengikat RIPK1 kemudian mengaktifasi RIPK3 dan MLKL akhirnya menginduksi nekroptosis (Wang *et al.*, 2014, Rodriguez *et al.*, 2016). *Type III Secretion System* (T3SS) melibatkan flagela yang berhubungan dengan pelepasan sitotoksin antara lain ExoS dari sitoplasma *Pseudomonas aeruginosa* langsung ke dalam sitosol sel inang. T3SS yang menginjeksi ExoS pada makrofag tak menyebabkan maturasi proteolitik yang disebabkan *Pseudomonas aeruginosa* dan mensekresi sitokin proinflamasi IL-1 (Hobden, 1997), dan pada penelitiannya menunjukkan adanya peningkatan *polymorphonuclear*, IL-1 β dan IFN- γ pada kornea tikus yang diinfeksi dengan *Pseudomonas aeruginosa*. Defisiensi ExoS juga merubah cara kematian dari apoptosis

ke arah pyroptosis (Galle, 2012). T3SS mempunyai aktifitas mengaktivasi inflammasome NLR, memicu aktivasi *caspase-1* melalui NLRC4 (Hauser, 2009), dengan kata lain fungsi T3SS penting untuk menginduksi aktivitas *caspase-1*, sekresi IL-1 β dan kematian sel (Franchi *et al.*, 2007). Oka *et al.*(2015) meneliti *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari lensa kontak pasien, melaporkan adanya interaksi faktor virulensi, yaitu *swarming motility*, *swimming motility*, dan protease ExoS. Eksotoksin A yang disekresi oleh TIIS (Type II Secretion System) menunjukkan keterlibatannya dalam invasi dan kerusakan jaringan. Sitotoksin ini dikode oleh gen *tox A* dan ditemukan pada sebagian besar isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* (Passador dan Iglewski, 1994). Pemeriksaan histopatologi hati tikus yang diinjeksi dengan eksotoksin A *Pseudomonas aeruginosa* dengan dosis lebih dari 3 dan 4 μ g/ml menunjukkan degenerasi hati dengan adanya vakuol hepatosit dan sel radang yang banyak disertai adanya sel apoptotik. Adanya sel apoptotik ini dapat dijelaskan dengan mekanisme sensitisasi terhadap TNF, hambatan sintesis protein pada kerusakan hati (Jendrossek, 2001, Chao, 2002). Pada proses apoptosis, *caspase-3* merupakan marker penting yang meregulasi peradangan jalur sinyal, berperan pada destruksi selular seperti fragmentasi DNA atau degradasi protein sitoskeletal (Behzadi, 2015).

Mekanisme virulensi dan faktor-faktor virulensi infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada kornea masih memerlukan penelitian-penelitian lebih lanjut oleh karena masih banyak pertanyaan-pertanyaan yang belum terjawab, antara lain masih belum diketahui dengan pasti bagaimana dan kapan faktor-faktor virulensi yang telah ditemukan terlibat dalam patogenesis infeksi pada kornea, selain itu terapi antibiotik pada infeksi *Pseudomonas aeruginosa* dapat sementara menekan gejala klinis tetapi tidak mengeradikasi bakteri tersebut. *Pseudomonas aeruginosa* secara intrinsik resisten terhadap sejumlah besar antibiotik dan dapat terjadi resistensi juga terhadap antibiotik

yang lain sehingga terapi menjadi sulit (Alhazmi, 2014). Setelah pemberian antibiotik yang kuatpun, ulkus kornea masih dapat mengalami perforasi pada 30% kasus (Chidambaram *et al.*, 2017), oleh karena itu sangat penting untuk menemukan obat selain antibiotik yang lebih efektif dengan pendekatan strategi baru untuk menghadapi infeksi saat ini terutama diagnosis dan penanganan dini yang tepat agar tidak terjadi komplikasi yang berat. Penelitian-penelitian lanjutan diperlukan segera dengan tujuan akhir mencegah progresifitas, meningkatkan peluang kesembuhan serta mengurangi komplikasi perforasi kornea yang tidak hanya menyebabkan kebutaan, tetapi juga menyebabkan hilangnya integritas bola mata akibat infeksi *Pseudomonas aeruginosa* dengan menambah informasi mekanisme patogenesis pada jalur kematian sel, dan pada penelitian ini yang diteliti adalah jalur kematian sel epitel kornea melalui analisis caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, dan caspase-3.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat peningkatan ekspresi caspase-1 pada kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada model tikus (*Rattus norvegicus*) ?
2. Apakah terdapat peningkatan ekspresi TNF α pada kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada model tikus (*Rattus norvegicus*) ?
3. Apakah terdapat peningkatan ekspresi RIPK1 pada kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada model tikus (*Rattus norvegicus*) ?
4. Apakah terdapat peningkatan ekspresi RIPK3 pada kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada model tikus (*Rattus norvegicus*) ?
5. Apakah terdapat peningkatan ekspresi caspase-3 pada kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada model tikus (*Rattus norvegicus*) ?

6. Bagaimana mekanisme kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa* yang melibatkan perubahan ekspresi caspase-1, TNF α , RIPK1, RIPK3, dan caspase-3 pada model tikus (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menganalisis mekanisme kematian sel epitel kornea oleh karena infeksi *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan peningkatan ekspresi caspase-1 pada sel epitel kornea tikus *Rattus Norvegicus* yang diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* lebih tinggi daripada kontrol.
2. Membuktikan peningkatan ekspresi TNF α pada sel epitel kornea tikus *Rattus norvegicus* yang diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* lebih tinggi daripada kontrol.
3. Membuktikan peningkatan ekspresi RIPK1 pada sel epitel kornea tikus *Rattus Norvegicus* yang diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* lebih tinggi daripada kontrol.
4. Membuktikan peningkatan ekspresi RIPK3 pada sel epitel kornea tikus *Rattus Norvegicus* yang diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* lebih tinggi daripada kontrol.
5. Membuktikan peningkatan ekspresi caspase-3 pada sel epitel kornea tikus *Rattus Norvegicus* yang diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* lebih tinggi daripada kontrol.
6. Menganalisis mekanisme kematian sel epitel kornea melalui peningkatan ekspresi caspase-1, RIPK1, RIPK3, caspase-3, dan TNF α pada kornea tikus *Rattus Norvegicus* yang diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

1. Memberikan informasi tentang mekanisme kematian sel epitel kornea melalui jalur kematian sel pada tikus *Rattus Norvegicus* yang diinfeksi dengan *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Sebagai data ilmiah dan data penunjang penelitian lain yang berkaitan dengan virulensi *Pseudomonas aeruginosa* melalui jalur kematian sel yang sampai saat ini masih belum banyak diketahui.

1.4.2 Manfaat praktis

1. Dasar pengembangan strategis untuk pencegahan progresifitas, meningkatkan peluang kesembuhan, mengurangi komplikasi serta terapi pada awal infeksi antara 1 hingga 72 jam melalui pendekatan imunologi-biologi molekuler jalur kematian sel terhadap infeksi kornea oleh karena *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Memberi informasi terhadap tenaga medis dan paramedis tentang pentingnya diagnosis dan penanganan dini yang tepat terhadap keratitis oleh karena *Pseudomonas aeruginosa* serta memberi edukasi terhadap masyarakat yang mengalami trauma mata dan pengguna lensa kontak tentang resiko infeksi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* untuk mencegah kebutaan yang dapat menimbulkan kerugian moril dan materil.