

Comparasion of Topical and Subconjungtival Curcumin Injection on Corneal Neovascularization on Alkali Injuries of Wistar's Cornea.

Rakhmasari Y.A¹, Sri Inakawati¹, Siti Sundari¹, Winarto¹, Ediati Sasmito²

¹Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Diponegoro University, Semarang, Central Java

²Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University Yogyakarta

ABSTRACT

Background: Neovascularization of the cornea causing loss of corneal clarity, decrease of visual acuity and also improve the failure of Keratoplasty. It can occur due to the imbalance of angiogenic and antiangiogenic factors such as on chemical trauma. Curcumin is the active extract which have anti-angiogenesis pharmacological effect. Subconjungtival injection have many advantages compared with topical administration. The purpose is to compare the effect of subconjunctival curcumin injection and topical curcumin on corneal neovascularization on alkali injuries of wistar's cornea.

Methods: Experimental study with post test only control group design using 28 male Wistar rat strain which received chemical trauma. The samples were randomly divided into 4 group. Topical curcumin 80 $\mu\text{mol/L}$, topical DMSO 0,1% five times daily for 7 days. Subconjunctival injection of curcumin 40 $\mu\text{mol/L}$ and DMSO 0,1% were received once after the chemical trauma on the cornea. On day 8 was measured the corneal neovascularization in length of blood vessels and width of area. Statistically hypotheses with independent t-test and significant $p < 0,05$.

Result: Subconjunctival injection of curcumin group were significantly reduced the area of corneal neovascularization than topical curcumin group ($p = 0,045$).

Conclusion: Subconjunctival injection of curcumin needs further study to compare the benefits and side effects

Keywords: Curcumin, topical, Subconjunctival injection, corneal neovascularization

Neovaskularisasi kornea adalah terbentuknya pembuluh darah pada kornea yang seharusnya avaskular.^{1,2} Kondisi avaskular kornea disebabkan adanya keseimbangan antara mediator angiogenik dan antiangiogenik. Mediator antiangiogenik yang terdapat pada kornea adalah *angiostatin*, *restin*, *endostatin*, dan *pigmen epithelium derived factor*. Mediator angiogenik terdiri dari *Vascular*

Endothelial Growth Factor (VEGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) dan *matrix metalloproteinases* (MMPs).³⁻⁵

Traumakimia padamata dapat menimbulkan dampak yang berat sehingga memicu timbulnya neovaskularisasi pada kornea.^{6,7} Neovaskularisasi kornea dapat memperburuk prognosis transplantasi kornea / keratoplasti karena menyebabkan

hilangnya *immune privilege* kornea. Angka reaksi penolakan terhadap graft kornea dapat meningkat hingga 30 %.^{2,8}

Kurkumin adalah suatu bahan fitofarmaka hasil ekstraksi rimpang kunyit atau *Curcuma longa* yang diketahui mempunyai anti inflamasi dan efek inhibisi terhadap faktor angiogenik.^{1,9} Kurkumin mencegah timbulnya neovascularisasi kornea dengan cara menghambat proses proliferasi sel endotel primer dan menekan munculnya bFGF dan VEGF.^{9,10} Kim et al telah membuktikan bahwa pemberian kurkumin 80 $\mu\text{mol/L}$ tetes mata dapat efektif menghambat NF- κB yang akan mengekspresikan pembentukan VEGF.^{2,11}

METODE

Hewan coba

Sampel penelitian adalah 28 tikus strain *Wistar* galur murni yang berasal dari bagian Farmakologi Fakultas Farmasi UGM dengan kriteria inklusi tikus strain *Wistar* jantan, umur 6 – 8 minggu, berat badan 150 – 200 gram, tampak aktif dan pada pemeriksaan luar tidak tampak adanya kelainan anatomi khususnya kelainan pada mata, kemudian pada salah satu matanya diberi trauma basa. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah tikus yang memiliki ukuran diameter lesi akibat paparan trauma basa melebihi 2 mm, kornea tikus yang dalam waktu 7 hari mengalami perforasi, tikus yang mati selama 7 hari perlakuan. Semua tikus diaklimatisasi selama 1 minggu.

Trauma Basa

Semua tikus mendapat perlakuan sama, yaitu dibuat model trauma basa kornea dengan cara diberikan kontak pada permukaan kornea sentral selama 10 detik dengan kertas saring diameter 1 mm yang telah dibasahi NaOH 1 M. Sebelumnya dilakukan anestesi umum dengan ketamin HCl 50 mg/KgBB intramuskular. Kemudian irigasi dengan *Aquades for irrigation* 15 menit hingga pH netral (diukur dengan pH indikator).

Metode penelitian dan cara kerja

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *post test control group only*

design. Seluruh tikus dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 7 ekor. Setelah mendapat trauma basa masing-masing kelompok mendapat perlakuan yang berbeda yaitu, kurkumin tetes mata dan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 0,1 % tetes mata yang masing - masing diberikan 5 kali sehari selama 7 hari. injeksi kurkumin dan DMSO 0,1 % subkonjungtiva masing - masing diberikan 1 kali setelah perlakuan trauma basa. Kurkumin tetes mata dan injeksi dibuat dari *curcumin* (Sigma, Singapura) yang dilarutkan dalam DMSO sehingga mempunyai dosis 80 $\mu\text{mol/L}$ untuk tetes mata dan 40 $\mu\text{mol/L}$ untuk injeksi. Kelompok kontrol diberikan DMSO 0,1 % baik untuk tetes mata maupun injeksi.

Pemeriksaan panjang dan luas area neovaskularisasi

Seluruh kelompok dilakukan penilaian terhadap panjang dan luas area neovaskularisasi pada hari ke-8. Anestesi umum menggunakan injeksi *Ketamine HCl* 100 mg/KgBB intramuskular dilakukan sebelum pengukuran. Pengukuran dilakukan di bawah mikroskop. Panjang neovaskularisasi diukur berdasarkan pembuluh darah yang tumbuh di kornea dari limbus ke arah sentral kornea yang diukur dari pangkal sampai ujung pembuluh darah terpanjang menggunakan kaliper dan dinyatakan dalam satuan millimeter. Luas area neovaskularisasi diukur berdasarkan area di limbus yang terdapat pertumbuhan pembuluh darah yang dibagi menjadi 12 bagian. Masing-masing bagian berada di depan sudut 30° dengan titik pusat adalah sentral kornea diukur menggunakan model berbentuk lingkaran dan dibagi menjadi 12 bagian dan dinyatakan dalam persen (%).¹¹

Analisa Statistik

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Uji panjang neovaskularisasi dan luas area neovaskularisasi kornea yang terjadi menggunakan uji t-test independent dengan nilai signifikansi $p < 0,05$

HASIL PENELITIAN

Pemeliharaan dilakukan di bagian Farmakologi Fakultas Farmasi UGM Selama penelitian tidak dijumpai adanya tikus yang mati maupun sampel

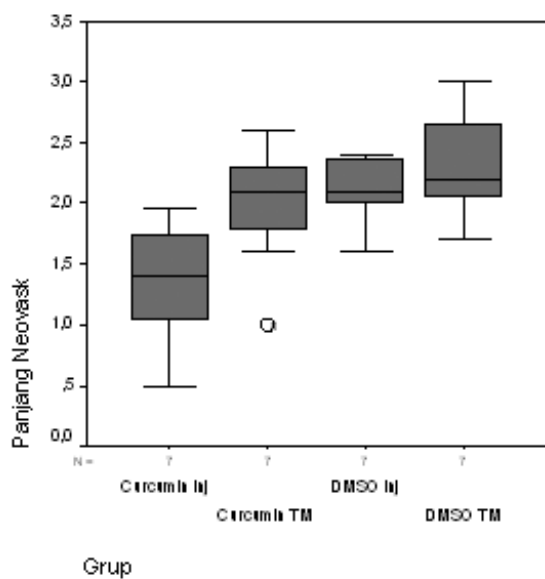
droup-out. Tidak didapatkan adanya perdarahan sub konjungtiva, timbulnya infeksi ,nekrosis jaringan pada tempat injeksi maupun penetrasi jarum ke bola mata. Deskripsi hasil pemeriksaan panjang neovaskularisasi kornea disusun dalam bentuk table dan gambar.

Tabel 1. Panjang neovaskularisasi kornea kelompok kurkumin 80 µmol/mL tetes mata dengan kelompok kurkumin 40 µmol/mL injeksi subkonjungtiva.

Kelompok	n	Min (mm)	Max (mm)	Mean (mm)	SD
Tetes mata	7	1,00	2,60	1,99	0,53
Injeksi	7	0,50	1,95	1,35	0,53

$p = 0,045$

Tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran rerata panjang neovaskularisasi kornea serta variasi pengukuran lainnya pada kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi. Pengukuran rerata panjang neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata ($1,99 \pm 0,53$ mm) tampak lebih panjang dibandingkan kelompok kurkumin injeksi subkonjungtiva ($1,35 \pm 0,53$ mm). Pengukuran panjang minimal dan maksimal neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva juga menunjukkan kondisi yang sama. Hasil uji statistik terhadap rerata panjang neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. ($p = 0,045$).



Gambar 1. Boxplot panjang neovaskularisasi kornea

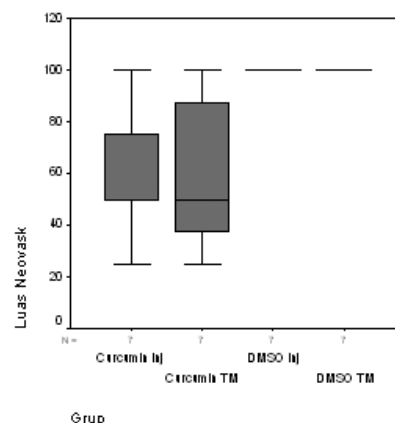
Gambar 1 menunjukkan perbedaan rerata panjang neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata, DMSO tetes mata, kurkumin injeksi subkonjungtiva dan DMSO injeksi subkonjungtiva. Terlihat bahwa rerata panjang neovaskularisasi kornea pada kelompok injeksi kurkumin subkojungtiva lebih pendek dibandingkan kelompok lainnya.

Tabel 2. Luas area neovaskularisasi kornea kelompok kurkumin 40 µmol/mL tetes mata dan kurkumin 80 µmol/mL injeksi subkonjungtiva.

Kelompok	n	Min (%)	Max (%)	Mean (%)	SD
Tetes mata	7	25,00	100,00	60,71	31,81
Injeksi	7	25,00	100,00	64,29	24,40

$p = 0,818$

Tabel 2 menunjukkan perbandingan rerata luas area neovaskularisasi kornea serta berbagai variasi pengukuran lainnya pada kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva. Pengukuran rerata luas area neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin injeksi subkonjungtiva ($64,29 \pm 24,40\%$) terlihat lebih besar dibandingkan dengan kelompok kurkumin tetes mata ($60,71 \pm 31,81\%$). Tidak ada perbedaan dari hasil pengukuran minimal dan maksimal luas area neovaskularisasi kornea pada kedua kelompok ini. Nilai pengukuran minimal luas area neovaskularisasi kornea pada kedua kelompok terlihat sama adalah 25% dan nilai pengukuran maksimal adalah 100%. Hasil uji statistik terhadap luas area neovaskularisasi kornea kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva menunjukkan adanya perbedaan yang tidak bermakna. ($p = 0,818$).



Gambar 2. Boxplot luas area neovaskularisasi kornea

Gambar 2 menunjukkan perbedaan rerata luas area neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata, DMSO tetes mata, kurkumin injeksi subkonjungtiva dan DMSO injeksi subkonjungtiva. Terlihat bahwa rerata luas area neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata lebih pendek dibandingkan kelompok lainnya.

DISKUSI

Neovaskularisasi kornea pada dasarnya merupakan suatu proses penyembuhan luka di kornea, tetapi tidak menguntungkan karena kejernihan kornea terganggu.¹²⁻¹⁷ Kendala lain akibat neovaskularisasi kornea adalah meningkatkan angka kegagalan keratoplasti akibat reaksi penolakan graft kornea.^{2,8,18-20}

Berbagai macam penelitian penggunaan obat dan tatalaksana untuk mengatasi problem neovaskularisasi sudah banyak dilakukan. Tatalaksana neovaskularisasi kornea yang optimal sampai saat ini masih terus digali oleh para klinisi dan peneliti.^{3,4}

Kurkumin merupakan ekstrak *curcuma longa* yang mempunyai efek farmakologi beragam dimana salah satunya adalah sebagai anti angiogenesis. Efek anti angiogenesis kurkumin adalah dengan menghambat jalur NF- κ B melalui IL-1, sehingga menekan ekspresi VEGF, bFGF dan MMP-9 sebagai faktor-faktor yang berperan dalam angiogenesis.^{9,10,21,22}

Penelitian Arbiser et al dan Chandru H, Sharada A.C yang menyatakan bahwa pemberian kurkumin 80 μ mol/L tetes mata efektif menghambat proliferasi sel endothel dan bFGF sebagai mediator neovaskularisasi pada kornea tikus. Kim et al juga melaporkan hasil penggunaan kurkumin topikal sangat bermanfaat dalam menghambat neovaskularisasi kornea pada kelinci percobaan.^{2,9,10,23}

Penelitian oleh Fan Su dan Chang Zhang yang menyatakan bahwa pemberian kurkumin 40 μ mol/L injeksi subkonjungtiva efektif menghambat neovaskularisasi pada model trauma basa kornea tikus. Hasil yang diperoleh ini mendukung teori yang sudah disampaikan sebelumnya yaitu adanya sifat kurkumin sebagai zat antiangiogenesis yang dapat menghambat ekspresi VEGF, bFGF dan MMP-9 melalui jalur NF- κ B.^{2,21,23}

NF- κ B juga distimulasi melalui jalur lain oleh PAF (*platelet activating factor*). yaitu proses transkripsi yang akan meningkatkan faktor angiogenik seperti VEGF, bFGF dan MMP-9 serta menurunkan faktor antiangiogenik seperti TSP-1 (*trombospodin-1*) di fibroblast. Hal inilah yang menyebabkan tetap terbentuknya neovaskularisasi kornea pada penelitian ini oleh karena adanya jalur pembentukan neovaskularisasi kornea yang tidak dihambat oleh kurkumin.^{2,13,21-24}

Injeksi sub konjungtiva merupakan salah satu alternatif pemberian obat pada bola mata. Cara pemberian ini mempunyai kerugian berupa timbulnya efek traumatik yang dapat berupa perdarahan sub konjungtiva, timbulnya infeksi, nekrosis jaringan pada tempat injeksi, dan penetrasi jarum ke bola mata.^{24,25,27}

Namun demikian injeksi sub konjungtiva mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan pemberian topikal, yaitu obat yang diberikan dapat lebih terkonsentrasi pada organ target, membutuhkan dosis yang lebih kecil dibandingkan pemberian tetes maupun sistemik serta obat mudah mencapai segmen anterior maupun posterior bola mata. Berdasarkan teori tersebut, pemberian injeksi sub konjungtiva mempunyai keunggulan dibandingkan dengan pemberian topikal.²³⁻²⁷

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak adanya pengukuran panjang masing-masing pembuluh darah neovaskularisasi kornea yang terbentuk secara detail dan konfirmasi dengan kerapatan pembuluh darah neovaskularisasi kornea yang terbentuk. Pengukuran panjang neovaskularisasi kornea dengan perwakilan satu pembuluh darah terpanjang kurang bisa menggambarkan hambatan atau stimulasi neovaskularisasi kornea yang terjadi. Kesulitan pengukuran luas area neovaskularisasi kornea karena bentuk anatomi mata tikus Wistar yang terlalu cembung. Cara pengamatan luas area neovaskularisasi kornea yang dilakukan oleh peneliti sulit diaplikasikan pada kondisi kornea tikus Wistar yang cembung tersebut. Saat ini belum ada kepustakaan yang menyatakan cara pengamatan luas area neovaskularisasi kornea yang paling efektif untuk kondisi mata tikus Wistar, sehingga perlu dipikirkan cara pengukuran luas area neovaskularisasi yang lebih akurat.

Hasil uji statistik panjang neovaskularisasi kornea antara kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna untuk panjang neovaskularisasi kornea ($p = 0,045$). Hasil ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pemberian injeksi sub konjungtiva mempunyai keunggulan dibandingkan dengan pemberian topikal dimana obat yang diberikan dapat lebih terkonsentrasi pada organ target, membutuhkan dosis yang lebih kecil dibandingkan pemberian tetes maupun sistemik serta obat mudah mencapai segmen anterior maupun posterior bola mata.^{2,25,27}

Luas area neovaskularisasi kornea pada kelompok kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p=0,818$). Hal ini dapat disebabkan adanya kesulitan pengukuran luas area neovaskularisasi kornea karena bentuk anatomi mata tikus Wistar yang terlalu cembung sehingga sulit untuk diaplikasikan pada kondisi kornea tikus Wistar yang cembung tersebut. Penyebab lain adalah kemungkinan cara yang digunakan untuk mengukur luas neovaskularisasi masih kurang sensitif belum mampu menggambarkan luas neovaskularisasi kornea secara lebih detail.

KESIMPULAN

Neovaskularisasi kornea setelah pemberian kurkumin injeksi subkonjungtiva lebih pendek dibandingkan kurkumin tetes mata. Tidak terdapat perbedaan luas area neovaskularisasi kornea pada pemberian kurkumin tetes mata dan kurkumin injeksi subkonjungtiva.

REFERENSI

- Shakiba Y, Mansouri K, Arshadi D, Rezaei N. Corneal Neovascularization : Molecular Event and Therapeutic Options (on line) : URL. <http://www.benthamscience.com/iad/samples/iad3-3/0009IAD.pdf>.2009
- Kim Sub J, et al. The Effect of Curkumin on Corneal Neovascularization in Rabbit Eyes. 2010 (on line): URL: <http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=dc6cda8e-775f-42c1-bbe0-53597f67afb8%40sessionmgr114&vid=1&id=111>
- Oh Youn J, et al. The Anti-inflammatory Effect of Subconjunctival Bevacizumab on Chemically Burned Rat Corneas. Current Eye Research. 2009.
- Yoeruek E, et al. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. 2008 (on line) : URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0420.2007.01049.x/pdf>
- Bahar I, et al. Subconjunctival Bevacizumab Injection for Corneal Neovascularization. Cornea. 2008
- Bugher, Scrage et all. Chemical Ocular Burn. Springer. 2011; 2: 9
- Liesegang TJ, Skuta GL, Cantor LB. External Disease and Cornea. Section 8. San Fransisco: The Foundation of American Academy of Ophthalmology; 2009: 8-12,383-390.
- Fuchsluger T.A, et al. Limbal Stem CellDeficiency and Corneal Neovascularization. Seminars in Ophthalmology. 2009
- J.L.Arbiser, et al. Kurkumin is an In Vivo Inhibitor of Angiogenesis. (on line) : URL. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2230271/>
- Chandru H, Sharada A.C. Antiangiogenic Effect of Synthetic Analogs of Kurkumin *in vivo*.(on line) : URL. <http://www.ajol.info/index.php/ajbr/article/viewFile/50644/39340>. 2007
- Kenyon et al. A Model of Angiogenesis in the Mouse Cornea. Investigative Ophthalmology and Visual Science.1996
- Azar D. Corneal angiogenic privilege : angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. Transaction of the American Ophthalmological Society. (on line) : URL. http://www.aonline.org/xaction/2006/1545-6110_v104_p264.pdf. 2006
- Shan Siqing, Dewhirst Mark W. Angiogenesis Assays : A Critical Appraisal of Current Techniques. England. 2006 :171-222
- Kenchegowda S, Bazan H. Significant of Lipid Mediators In Corneal Injury and Repair. Journal of Lipid Research. 2009; 51: 879-91
- Qazi Y,Madulla S,Ambati B. Mediators of ocular angiogenesis.Utah : Departement of Ophthalmology,Jhon Moran Eye Centre.2009
- Ferrara N. Angiogenesis From Basic Science to Clinical Application.New York : CRC PressTaylor & Francis Group;2007 : 1-53
- Clauss M,Breiner G.Mechanism of Angiogenesis. Berlin : Springer;2005 :209-300
- Kanski JJ. Clinical Ophthalmology. A Systematic Approach. 6th ed. Edinburg: Buittenworth-Heinemann; 2007: 313-16
- Kvana A. Ocular Angiogenesis The Role of Growth Factorst. Acta ophthalmologica Scandinavica 2006,84: 282-88
- Tink JT, Barnstable CJ. Ocular Angiogenesis : Mechanism and Theurapeutics. New Jersey. Humana Press Inc. 2006 ; 45-66
- Jurenka, J. Anti-inflammatory Properties of Kurkumin, a Major Costituent of *Curcuma Longa*: A Review of Preclinic and Clinical Research. Alternative Medicine Review. 2009; 14: 141-53
- W.J. Stanley, H.Robert. Pharmacology of DMSO. Department of Surgery,Oregon Health Science University. (On Line) : URL <http://www.dmsol.org/articles/information/herschler.htm>
- Fan Su, Chang Zhang. Inhibitory effect of curcumin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. (on line) : URL. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497527>
- Casser L, Fingaret M, Wodeme HT. Atlas of Primary Eyecare Procedures (On Line) : URL. <http://www.iovs.org/content/37/8/1625.full.pdf+html>.1997
- Narayan PS. Cheruvu. Transscleral drug delivery. (On Line) : URL http://books.google.co.id/books?id=jF_qHAcHJ7oC&pg=PA39&dq=subconjunctival+injection+pathway&hl=id&ei=hq5JTo-zO6jZmAWojcmGCA&sa=X&oi=book_