

## Perbedaan Epitel dan Kolagen pada Luka Bakar Derajat II Antara Pemberian Ekstrak Sel Punca Mesenkimal Tali Pusat Manusia dengan Silver Sulfadiazine pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague-Dawley*

Ni Made Ariyuliami Savitri<sup>1</sup>, Evi Kurniawaty<sup>2</sup>, Efrida Warganegara<sup>3</sup>

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

### Abstrak

Silver sulfadiazine merupakan standar baku emas dalam terapi topikal penyembuhan luka bakar. Saat ini telah dikembangkan terapi lain untuk membantu proses penyembuhan luka, diantaranya menggunakan ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia karena sel punca dapat mempercepat pembentukan epitel dan kolagen sehingga mempercepat proses penyembuhan luka. Penelitian ini menggunakan 27 ekor tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang dibagi 9 kelompok perlakuan kelompok K4, K14, dan K28 merupakan kelompok kontrol, kelompok SC4, SC14, dan SC28 merupakan kelompok yang diberikan terapi ekstrak sel punca, dan kelompok SSD4, SSD14, dan SSD28 merupakan kelompok yang diberikan terapi silver sulfadiazine. Pada hari ke-4, 14, dan 28 tikus dilakukan eutanasia untuk diambil kulitnya dan dilakukan pembuatan preparat dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* dan dilihat pembentukan epitel dan kolagennya dengan perbesaran 40x. Rata-rata skor epitelisasi hari ke-28 K28:5,33, SC:7,67, SSD28:8. Rata-rata skor kolagen hari ke-14 K14:6,67, SC14: 8,67, SSD14: 8. Rata-rata skor kolagen hari ke-28 K28:5, SC28:4, SSD28:3,67. Terdapat perbedaan bermakna ketebalan epitel pada hari ke-28 dan jumlah kolagen hari ke-14 dan 28

**Kata Kunci:** luka bakar, silver sulfadiazine, sel punca mesenkimal, epitel, kolagen

## The Difference of Epithelium and Collagen Formation in Second Degree Burn Wound Healing Between Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Extract and Silver Sulfadiazine Treatmen in Male Albino Rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley Strain

### Abstrack

Silver sulfadiazine is a gold standard in the topical healing treatment of burns. Currently, other therapies have been developed to help wound healing process, including using human stem cell mesenchymal stem extract because stem cells can accelerate the formation of epithelium and collagen, thus accelerating the wound healing process. This study used 27 male albino rats Sprague-Dawley strain which divided into 9 groups for treatment K4, K14, and K28 were the control group, SC4 group, SC14, and SC28 were the group given stem cell extract therapy, and group of SSD4, SSD14, and SSD28 was the group given silver sulfadiazine therapy. On the 4th day, 14th, and 28th rats euthanasia was performed for the skin and the preparations were made with hematoxylin-eosin staining and the formation of epithelium and collagen with 40x magnification. The mean score of re-epithelialization on the 28th day was group K28:5,33, SC:7,67, SSD28:8. Mean score of collagen formation on 14<sup>th</sup> day of group K14:6,67, SC14: 8,67, SSD14: 8. Mean score of collagen formation on 28<sup>th</sup> day of group K28:5, SC28:4, SSD28:3,67. There were significant differences re-epithelialization on day 28 and collagen formation on day 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup>.

**Keywords:** Burn injury, silver sulfadiazine, mesenchymal stem cell, epithelium, collagen

Korespondensi: Ni Made Ariyuliami Savitri, Jl. Bumi Manti I, Labuan Ratu, Bandar Lampung, Lampung, HP 082278351262, e-mail yuliami.made@gmail.com

### Pendahuluan

Luka bakar adalah suatu kerusakan jaringan yang disebabkan karena kontak dengan suhu yang sangat tinggi seperti api panas, bahan kimia, listrik, dan radiasi atau kontak dengan suhu yang sangat rendah<sup>1</sup>. Luka bakar 90% terjadi di negara yang memiliki penghasilan rendah dan infrastruktur minim untuk mencegah terjadinya luka bakar<sup>2</sup>. Pada tahun 2014, *World Health*

*Organization* (WHO) memperkirakan terdapat lebih dari 265.000 kematian yang terjadi setiap tahunnya akibat luka bakar dan kebanyakan terjadi di daerah Afrika, Asia tenggara, dan Timur Tengah. Di Indonesia sendiri luka bakar berada di peringkat 6 dalam cedera yang tidak disengaja dengan total 0,7% dari seluruh cedera (Kementerian kesehatan, 2013). Luka bakar merupakan masalah kesehatan yang serius, karena tidak hanya

menyebabkan kerusakan secara lokal, tetapi luka bakar dapat menyebabkan terjadinya efek sistemik seperti syok dan dapat mengakibatkan *multi-system organ failure* (MOF) yang membutuhkan perawatan intensif<sup>3,4</sup>

Proses penyembuhan luka bakar dibagi menjadi 3 fase utama yang saling tumpang tindih satu sama lain yaitu diawali dengan fase peradangan yang dimulai dengan terjadinya peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan migrasi sel radang, fase proliferasi ditandai dengan keratinosit yang bermigrasi ke area luka untuk membantu penutupan jaringan, fase maturasi merupakan fase terakhir yang dimulai dari hari ke 21 hingga sekitar 1 tahun<sup>3</sup>.

Kulit merupakan organ utama yang terpapar dengan dunia luar. Kulit memiliki fungsi berupa fungsi proteksi, termoregulasi, metabolik, ekskresi, absorpsi, dan persepsi. Penyembuhan kulit menjadi hal penting karena ketika kulit kehilangan kontinuitasnya maka fungsi kulit tidak dapat berjalan seperti seharusnya (Mescher, 2012). Oleh karena itu, Penyembuhan luka bakar memerlukan manajemen dan pengobatan yang tepat agar luka tidak mengakibatkan kerusakan yang semakin parah.

Salah satu cara yang efektif untuk perawatan luka bakar adalah obat topikal. *Silver sulfadiazine* (SSD) merupakan obat pilihan pertama untuk pengobatan luka bakar, SSD adalah antibiotik topikal golongan sulfonamid yang memiliki sifat *broad spectrum* untuk mencegah terjadinya infeksi di daerah luka. SSD mampu menghasilkan waktu penyembuhan 8-15 hari untuk *superficial burn* dan 14-21 hari untuk *deep dermal burn*<sup>2</sup>

Saat ini telah dikembangkan pengobatan dengan menggunakan sel punca (*stem cell*). Sel punca merupakan teknologi pengobatan terbaru dalam dunia kedokteran, banyak ilmuwan yang meneliti manfaat terapi sel punca, salah satunya dalam terapi penyembuhan kulit. Salah satu jenis sel punca yang dapat digunakan dalam terapi penyembuhan kulit adalah sel punca mesenkimal. Sel punca mesenkimal memiliki kemampuan yang baik dalam memodulasi respon inflamasi, mempercepat remodeling dari matriks ekstraseluler dengan merangsang peningkatan produksi dari kolagen,

meningkatkan ketebalan dari epidermis melalui percepatan epitelisasi dan meningkatkan migrasi dari fibroblas dan keratinosit sehingga mempercepat penutupan dari luka. (Lee *et al.*, 2016)

Sel punca mesenkimal dapat diperoleh dari *wharton jelly* yang terdapat di dalam tali pusat dan darah pada placenta segera setelah bayi lahir<sup>6,7</sup>. Kelebihan dari sel punca ini adalah prosedur pengambilannya yang tidak invasif, tidak menggunakan bedah tambahan dan diambil dari jaringan yang terbuang (Arno *et al.*, 2014). Penelitian eksperimental pada tikus putih jantan mengenai pemberian ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia terhadap percepatan penyembuhan luka sayat yang dilakukan oleh Nur dkk<sup>9</sup> menunjukkan hasil yang bermakna, pada tikus yang dioleskan dengan topikal ekstrak sel punca terjadi percepatan waktu penyembuhan luka dibanding kelompok kontrol.

## Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *post test only control group design*, untuk mengetahui perbedaan epitel dan kolagen pada luka bakar derajat II antara pemberian ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia dengan SSD pada tikus putih galur *Sprague-Dawley*.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2017 sampai bulan Januari 2018 dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Laboratorium Patologi Anatomi, dan *Animal House* Fakultas Keskokteran Universitas Lampung. Populasi penelitian adalah tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* berumur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 250-300 gram. Sampel diambil menggunakan rumus Federer dengan jumlah sampel perkelompok perlakuan 3 ekor dan terdapat 9 kelompok perlakuan, jadi jumlah sampel total adalah 27 ekor tikus, teknik sampling menggunakan *simple random sampling*.

Kelompok perlakuan terdiri dari K4, K14 dan K28 yang menjadi kelompok kontrol tanpa diberikan terapi apapun diterminasi pada hari ke-4, 14, dan 28. Kelompok SC4, SC14, SC28 kelompok yang diberi terapi topikal menggunakan ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia diterminasi pada hari ke-4,

14, dan 28. Kelompok SSD4, SSD14, dan SSD28 yang diterminasi pada hari ke-4, 14, dan 28.

Pembuatan luka bakar dilakukan menggunakan uang logam dengan berat 5,34 gram, tebal 1,83 mm, dan diameter 24 mm. Logam dibalut menggunakan kassa dan direndam pada air mendidih dengan suhu 98°C selama 3 menit lalu setelah itu ditempelkan pada kulit tikus, sebelumnya dilakukan pencukuran rambut dan pemberian anestesi menggunakan ketamin 50mg/kg dan xylazin 5mg/kg. Setelah luka bakar terbentuk dilakukan *debridemen* dan bilas luka menggunakan akuades.

Pada hari ke 4, 14, dan 28 dilakukan eutanasia pada tikus dan sampel dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi dan dibuat preparat menggunakan pewarnaan *hematoxylin-eosin* dan dilakukan penilaian

ketebalan dan jumlah kolagen dengan penilaian sebagai berikut:

Penilaian ketebalan epitel:

0 : Tidak terdapat adanya epitel

1: Epitel sangat tipis <30% epitel kulit normal

2: Epitel tipis  $\geq 30\%$  kulit normal

3: Epitel sedang  $\geq 60\%$  epitel kulit normal

4: Epitel baik >80% epitel kulit normal

Penilaian jumlah kolagen:

0: Tidak terdapat pembentukan kolagen

1: Kolagen sangat sedikit

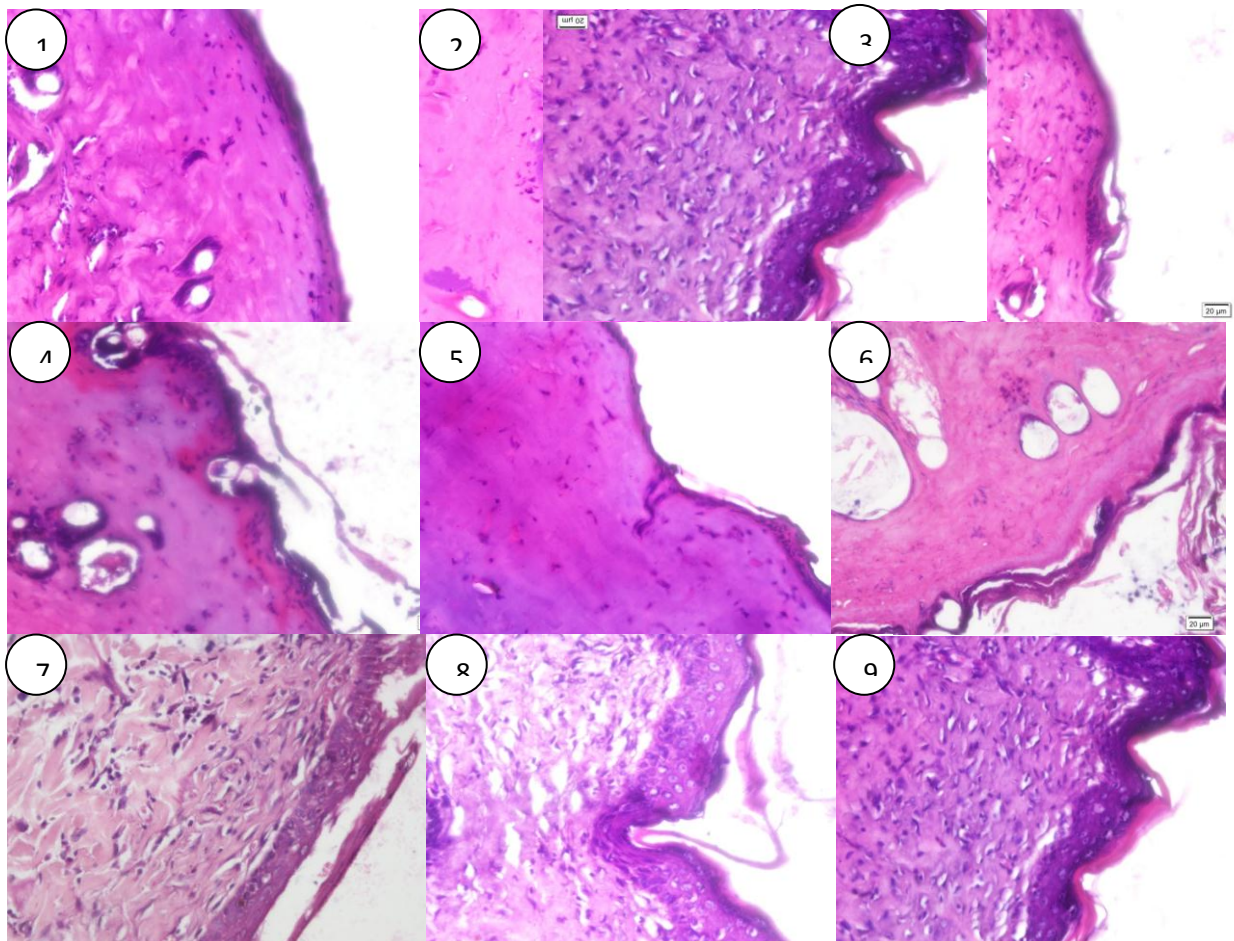
2: Kolagen sedikit

3. Kolagen sedang

4. Kolagen banyak

### Hasil dan Pembahasan

Berikut gambaran mikroskopis perbedaan epitel dan kolagen:



**Gambar 1. Mikroskopis Epitel dan kolagen**

Keterangan: 1. K4 2. SSD4 3. SC4 4. K14 5. SSD14 6. SC14 7. K28 8. SSD28 9. SC28

Dari gambar diatas diperoleh bahwa semakin hari ketebalan epitel semakin meningkat, hari ke-4 didapatkan pembentukan epitel yang masih sangat tipis disemua kelompok perlakuan hanya mendapat skor 1, begitu juga

hari ke-14 rata-rata skor yang didapatkan adalah 1 pada lapang pandang yaitu terdapat adanya epitel namun ketebalannya  $\leq 30\%$  epitel normal, pada hari ke-28 epitel paling tebal terdapat pada kelompok SSD dan ekstrak

sel punca dengan ketebalan epitel kategori sedang yaitu ketebalan  $\geq 60$  % epitel kulit normal. Pada jumlah kolagen pada hari ke-4 dan 14 mengalami peningkatan dan pada hari ke-28 mengalami penurunan.

**Tabel 1. Perbedaan rerata ketebalan epitel dan analisis bivariat *Kruskal-Wallis***

| Kelompok  | Hari ke-4 | Hari ke-14 | Hari ke-28 |
|-----------|-----------|------------|------------|
| Kontrol   | 0,67      | 1,67       | 5,33       |
| Sel punca | 0,33      | 2,00       | 7,67       |
| SSD       | 0,33      | 2,00       | 8          |
| Nilai P   | 0,100     | 0,074      | 0,034      |

Dalam penelitian ini pada analisis pembentukan epitel hari ke-4 tidak didapatkan adanya perbedaan bermakna rerata pembentukan epitel antara 3 kelompok perlakuan. Pada hari ke-4 setelah terjadinya luka bakar merupakan fase peralihan antara fase inflamasi dengan fase proliferasi, Pada fase ini masih terjadi pelepasan mediator-mediator inflamasi pada kulit yang mengalami luka bakar sehingga belum terjadi epitelisasi dengan baik<sup>3</sup>.

Pada hari ke-14 juga didapatkan hasil analisis statistik yang tidak bermakna, namun terdapat perbedaan rerata pada parameter penilaian, pada kelompok SSD14 mendapatkan rerata 2,00, kelompok SC14 mendapat rerata 2,00 dan K14 mendapat rerata 1,67. Pada hari ke-28, pada hari ke-28 terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok K28 dengan SC28 dan K28 dengan SSD28, pada kelompok ini rerata skor parameter penilaian adalah 8 untuk kelompok SSD28, 7,67 untuk kelompok SC28, dan pada kelompok K28 mendapatkan skor 5,33.

Pada hari ke-14 merupakan bagian dari fase proliferasi dimana terjadi migrasi dari keratinosit dan fibroblas yang mempercepat terjadinya penutupan luka (Velnar *et al.*, 2009), kelompok dengan nilai tertinggi pada hari 14 dan 28 adalah kelompok SSD. SSD merupakan standar baku emas terapi topikal pada luka bakar. Eshafani *et al* (2012) menyatakan bahwa salep SSD memiliki efek positif pada fase proliferasi sehingga SSD dapat mempercepat terjadinya epitelisasi, disamping karena SSD memang sebagai antibiotik topikal (Setiabudy & Mariana, 2007) yang mencegah terjadinya komplikasi luka bakar yaitu infeksi yang dapat mengakibatkan luka semakin memburuk.

Pada analisis statistik *Mann Whitney* didapatkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok SSD28 dengan kelompok SC28, namun rerata nilai pada parameter terdapat perbedaan. Kelompok nilai rerata tertinggi setelah SSD pada hari ke-14 dan 28 adalah kelompok yang diberikan ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia, sel punca mesenkimal berperan dalam perbaikan dan penyembuhan luka dengan memicu diferensiasi, pergerakan dan sekresi parakrin sehingga proliferasi sel keratinosit pada luka menjadi lebih cepat dan dapat mempercepat proses epitelisasi (Arno *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). Apabila dilihat penyembuhan secara makroskopis akan tampak luka bakar yang diterapi menggunakan ekstrak sel punca mengalami penutupan yang lebih cepat dibanding dengan kelompok yang lain. Pada hari ke-28 setelah dilakukan eutanasia pada tikus dilakukan pemotongan bulu menggunakan pisau cukur, dikhawatirkan saat pemotongan bulu menyebabkan terjadinya kerusakan epitel sehingga skor epitelisasi pada kelompok sel punca tidak maksimal.

Pada kelompok kontrol hari ke-14 dan 28 memiliki nilai rerata paling rendah, kemungkinan telah terjadi infeksi pada kelompok kontrol karena tidak dilakukan pengobatan untuk mencegah infeksi sehingga memperpanjang proses peradangan pada luka dan menyebabkan pembentukan epitel dan penutupan luka menjadi semakin lama.

**Tabel 2. Perbedaan rerata jumlah kolagen dan analisis bivariat**

| Kelompok  | Hari ke-4 | Hari ke-14 | Hari ke-28 |
|-----------|-----------|------------|------------|
| Kontrol   | 4         | 6,67       | 5          |
| Sel punca | 5         | 8,67       | 4          |
| SSD       | 4,67      | 8          | 3,67       |
| Nilai P   | 0,236*    | 0,005#     | 0,030*     |

Keterangan: \*. Analisis *Kruskal-Wallis* #. Analisis *One-Way ANOVA*

Pada analisis perbedaan rerata pembentukan kolagen pada hari ke-4 didapatkan hasil tidak terdapat perbedaan rerata pembentukan kolagen antar kelompok, namun jika dilihat dari parameter nilai terdapat perbedaan rerata yaitu tertinggi kelompok SC4, disusul SSD4 dan yang paling rendah kelompok K4. Berbeda dengan analisis

pada hari ke-14, pada hari ke-14 terjadi perbedaan yang bermakna antara kelompok K14 dengan SC14 dan kelompok K14 dengan SSD14 tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok SC14 dengan kelompok SSD14.

Rerata pembentukan kolagen tertinggi pada hari ke-4 dan 14 terdapat kelompok yang diberikan ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia, Lee *et al* menyatakan bahwa sel punca mesenkimal mampu merangsang peningkatan produksi fibroblas dan kolagen yang meningkatkan perbaikan matriks ekstraseluler sehingga mempercepat terjadinya penyembuhan luka. Fibroblas memiliki peran yang penting pada fase proliferasi, fibroblas memproduksi matriks ekstraseluler yang akan mengisi kavitas luka dan menyiapkan landasan untuk migrasi keratinosit. Matriks ekstraseluler akan digantikan oleh kolagen tipe III yang juga diproduksi oleh fibroblas pada fase proliferasi.

Rerata pembentukan kolagen tertinggi ke-2 terdapat pada kelompok SSD4 dan SSD14, seperti yang telah dijelaskan pada pembahasan mengenai SSD, SSD merupakan baku emas dalam pengobatan topikal luka bakar, disamping karena SSD merupakan antibiotik SSD juga dapat memacu proliferasi fibroblas yang merupakan sumber utama dari pembentukan kolagen (Esfahani *et al.*, 2012).

Kelompok kontrol menjadi kelompok dengan rerata pembentukan kolagen paling rendah dibanding dengan ekstrak sel punca dan SSD, hal ini dapat terjadi karena pada kelompok kontrol tidak diberikan pengobatan apapun sehingga perjalanan penyembuhan luka berjalan tanpa adanya rangsangan dari obat apapun, lain dengan kelompok sel punca dan SSD.

Pada analisis hari ke-28 terdapat rerata perbedaan kolagen yang bermakna antara kelompok K28 dengan SC28 dan kelompok K28 dengan SSD28, dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok SS28 dengan SSD28. Terjadi penurunan jumlah kolagen yang cukup signifikan pada hari ke 28, Menurut perjalanan normal penyembuhan luka, hari ke-28 adalah perjalanan luka menuju ke fase maturasi, dimana *matrix metalloproteinase* (MMP) yang dihasilkan oleh fibroblas membantu mengganti kolagen tipe III dengan kolagen tipe I. Pada fase maturasi terjadi keseimbangan sintesis dan degradasi,

kolagen yang jumlahnya berlebihan akan dilakukan degradasi oleh enzim kolagenase dan hasil akhir fase maturasi ini adalah jaringan parut<sup>13</sup>.

### Simpulan

Terdapat perbedaan rerata ketebalan epitel pada hari ke-28 dan perbedaan jumlah kolagen pada hari ke-14 dan 28 pada luka bakar derajat II antara pemberian ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia dengan SSD.

### Daftar Pustaka

1. Moenadjat Y. Luka Bakar Masalah Dan Tatalaksana. Jakarta: FKUI. 2009.
2. Vincy LAIW, Bachelor CM, Science B, Supervisor P, Zhang H. Comparison of MEBO with Silver Sulfadiazine (Ag-S) for the treatment deep injury. Chin J Plast Burn Surg. 2004.
3. Tiwari V. Burn wound: how it differs from other wounds? Indian J Plast Surg. 2012;45(2):364-373.
4. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. Crit Care. 2015;19(1):1-12.
5. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):37.
6. Kim D-W, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S-D, Borlongan C. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. Int J Mol Sci. 2013;14(6):11692-712. doi:10.3390/ijms140611692.
7. Djauhari T. Sel Punca. Bioteknologi. 2010:91-6.
8. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. Stem Cell Res Ther. 2014;5(1):28-41.
9. Nur NN. Perbedaan penyembuhan luka sayat secara makroskopis antara pemberian topikal ekstrak sel punca mesenkimal tali pusat manusia dengan gel bioplacenton pada tikus putih jantan

- (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* [skripsi]. Bandarlampung: Universitas Lamping.2017.
10. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J Int Med Res. 2009;37(5):1528-42
  11. Setiabudy R, Mariana Y. Sulfonamid, kotrimoksazol, dan antiseptik saluran kemih. Dalam: Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth. Farmakologi Dan Terapi. Jakarta: Badan Penerbit FKUI. 2007.
  12. Ashkani-Esfahani S, Imanieh MH, Khoshneviszadeh M, et al. The healing effect of arnebia euchroma in second degree burn wounds in rat as an animal model. Iran Red Crescent Med J. 2012;14(2):70-4.
  13. Tanggo VTIP. Pengaruh pemberian topikal ekstrak kulit delima pada penyembuhan luka split thickness kulit tikus [tesis]. Surabaya: Universitas Airlangga. 2013.