

## Efektivitas Salep Kitosan terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimia pada *Rattus norvegicus*

### *Chitosan Oilment Effect on Chemical Wound Healing in Rattus norvegicus*

Fitri Rizkia Putri<sup>1</sup>, Sri Tasminatun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

<sup>2</sup>Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

\*Email: tasmi\_a@yahoo.co.id

#### Abstrak

Proses penyembuhan luka adalah satu respon terkoordinasi pada cedera jaringan yang menghasilkan kontraksi jaringan, penutupan luka, dan pemulihan. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa salep kitosan kadar 2,5% efektif dalam mempercepat penyembuhan luka dan meningkatkan persentase penyembuhan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kitosan terhadap gambaran histologis penyembuhan luka bakar kimia pada kulit melalui pengamatan ketebalan epitel dan jumlah fibroblas. Studi *in vivo*, tikus *Sprague Dawley* dibagi menjadi enam kelompok, kontrol tanpa perlakuan, kontrol vaselin, kontrol Bioplacenton<sup>®</sup>, salep kitosan dosis 1,25%, 2,5%, dan 5%. Punggung tikus diinduksi luka bakar derajat tiga dengan asam sulfat 75%. Formula kitosan dioleskan tiap hari sampai kriteria sembuh terkonfirmasi. Jaringan kulit yang telah sembuh dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE kemudian diukur ketebalan epitel dan jumlah fibroblasnya. Data dianalisis dengan ANOVA satu arah, dilanjutkan dengan LSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketebalan epitel paling tipis dihasilkan oleh salep kitosan 5% ( $13,31 \pm 4,05$ ) dengan nilai signifikansi ( $p = 0,015$ ). Jumlah fibroblas yang paling sedikit dihasilkan oleh salep kitosan 5% ( $49, 80 \pm 6,01$  sel) dengan nilai signifikansi ( $p = 0,000$ ). Penelitian ini membuktikan bahwa dosis salep kitosan terbaik adalah 5%.

Kata kunci: kitosan, luka bakar kimia, penyembuhan, gambaran histologis

#### Abstract

*The process of wound healing is a set of coordinated responses to tissue injury that results in tissue contraction, closure, and restoration. Previous study had shown that chitosan ointment 2,5% is effective in promoting wound healing and increasing healing percentage. This experiment has aim to gain the chitosan effect on histological properties in chemical burn healing of skin through epithelial thickness and number of fibroblast observation. In in vivo studies, rats Sprague Dawley were divided into six groups; control without treatment, vaseline control, Bioplacenton<sup>®</sup> control, chitosan ointment dose 1.25%, 2.5%, and 5%. A third degree burn of the backskin was performed by 75% sulfate acid. Chitosan formulations were day repeatedly applied on the burned areas until the final healing process criterias were confirmed. Healing tissue was evaluated by histology preparation with HE staining then its epithelial thickness and number of fibroblast were measured. The datas were analyzed by one way ANOVA, followed by LSD. The results indicated that the thinnest epithelial thickness was showed on chitosan 5% ( $13.31 \pm 4.05$ ) with a value of significance ( $p=0,015$ ). The fewest number of fibroblast is performed on chitosan 5% ( $49, 80 \pm 6.01$  cells) with a value of significance ( $p = 0,000$ ). This study proved the best chitosan ointment dose is 5%.*

Key words: chitosan, chemical burn wound, healing, histologic appearance

## PENDAHULUAN

Dalam hal pertahanan tubuh, kulit merupakan pelindung utama yang menghalangi masuknya zat-zat kimia, mikroba dan bahan yang bersifat iritatif, toksigenik maupun patogenik juga melindungi tubuh dari cedera benturan. Semakin iritatif zat kimia tersebut, semakin berat kerusakan yang terjadi.<sup>1</sup> Berdasarkan data dari Departemen Kesehatan RI (2008), prevalensi luka bakar di Indonesia adalah 2,2%.<sup>2</sup>

Permasalahan yang dihadapi dalam penatalaksanaan luka bakar adalah proses inflamasi berkepanjangan menyebabkan kerapuhan jaringan yang menimbulkan diskonfigurasi struktur jaringan dan berakhir dengan deformitas bentuk dan gangguan fungsi. Hal ini dapat dicegah dengan penatalaksanaan luka fase awal yang meliputi kehilangan dan atau kerusakan epitel maupun jaringan yang menjadi struktur di bawahnya.<sup>3</sup>

Efisiensi dan efektifitas dari perbaikan jaringan yang terluka menjadi suatu pokok yang ingin selalu dikembangkan agar mencapai kesembuhan sehingga berbagai macam strategi telah digunakan untuk mempercepat dan menyempurnakan proses penyembuhan luka.<sup>4</sup>

Kitosan adalah biopolimer alami yang berasal dari kitin, komponen utama dari kerangka Crustacea luar. Beberapa penelitian menyatakan kitosan efektif dalam mempercepat penyembuhan luka karena mempunyai sifat spesifik yaitu adanya sifat bioaktif, biokompatibel, anti bakteri, anti jamur dan dapat terbiodegradasi.<sup>5</sup>

Penyembuhan luka adalah suatu bentuk proses usaha untuk memperbaiki kerusakan jaringan yang terjadi secara fisiologi. Proses tersebut akan mengalami fase inflamasi, proliferasi, dan maturasi. Fibroblas dan epitel memiliki peranan besar dalam

penyembuhan luka. Proses reepitelisasi adalah proses yang pertama kali teretus untuk menutupi jaringan luka sehingga mencegah infeksi. Fibroblas mencetuskan terbentuknya kolagen yang memperkuat jaringan luka.<sup>6</sup>

Penelitian Wardono (2009),<sup>7</sup> menunjukkan kitosan 2,5 % dapat mempercepat waktu penyembuhan dan meningkatkan persentase penyembuhan luka bakar kimia. Karena itu, perlu dilakukan penelitian mikroskopis untuk mengetahui pengaruh pemberian kitosan secara topical terhadap gambaran histologi penyembuhan luka melalui pengamatan fibroblas dan epitel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kitosan terhadap gambaran histologis penyembuhan luka bakar kimia pada kulit melalui pengamatan ketebalan epitel dan jumlah fibroblas.

## BAHAN DAN CARA

Penelitian ini menggunakan model penelitian in vivo dengan hewan uji. Alat yang digunakan adalah cincin pembatas luka bakar (diameter 1,5 cm), alat pencukur rambut, gunting jaringan, pinset bedah, mortir, stamper, stopwatch, mortar, sendok, toples ukuran besar, mistar dan jangka sorong, sarung tangan, masker, kandang tikus, timbangan tikus, timbangan analitik, kamera, dan sungkup anastesi. Sedangkan bahan yang digunakan adalah 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berumur 6-8 minggu dengan berat  $\pm 180-230$  gram, asam sulfat 75%, serbuk kitosan murni yang diperoleh dari PT. Ultratrend Biotech Indonesia, vaselin golongan album, Bioplacenton®, aether, kapas dan alkohol 70%.

Penelitian dimulai dengan mengadaptasikan tikus selama 1 minggu sebelum penelitian. Bulu pada punggung kanan bawah tikus dicukur hingga

bersih. Tikus dibagi dalam 6 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan, kontrol negatif vaselin, kontrol positif Bioplacenton®, perlakuan salep kitosan dosis 1,25%, perlakuan salep kitosan dosis 2,5%, dan perlakuan salep kitosan dosis 5%. Pembuatan salep kitosan dilakukan dengan menformulasikan kitosan dengan bahan pembawa vaselin golongan album pada dosis 1,25%, 2,5% dan 5% kemudian salep dicampur sampai homogen.

Punggung tikus dicukur bersih sehingga memungkinkan untuk dibuat luka bakar kimia berdiameter 15 mm. Tikus dianestesi menggunakan aether secara inhalasi menggunakan masker anestesia dan toples besar. Penginduksian luka bakar kimia dengan diberi tetesan asam sulfat 75% ke dalam cacin pembatas dan ditunggu selama lima menit hingga terbentuk luka derajat tiga. Salep kitosan dioleskan tiap hari sampai luka sembuh. Tikus yang lukanya telah sembuh didekapitasi, diambil jaringan kulit bekas lukanya kemudian difiksasi dengan for-

malin 10%. Jaringan kulit tersebut kemudian dibuat preparat histologi dengan pengecatan HE. Setelah mendapat pengecatan, preparat diamati dengan mikroskop cahaya untuk mendapatkan data mikroskopis yaitu ketebalan epitel dan jumlah fibroblas. Data ketebalan epitel dan jumlah fibroblas diolah dengan analisis ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji LSD.

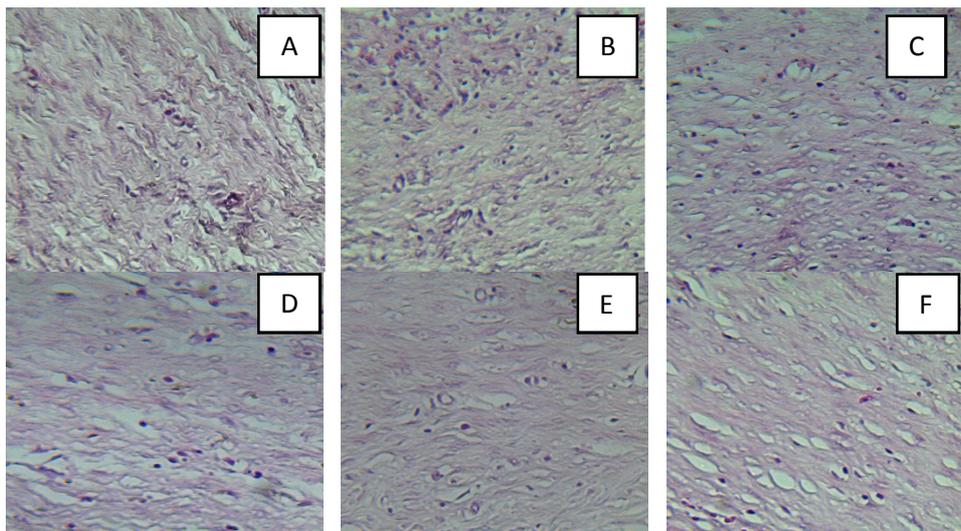
## HASIL

Hasil penampakan jaringan kulit yang sudah sembuh di tiap kelompok dengan pengecatan HE adalah seperti pada Gambar 1. Gambar tersebut digunakan untuk menghitung rata-rata jumlah fibroblas.

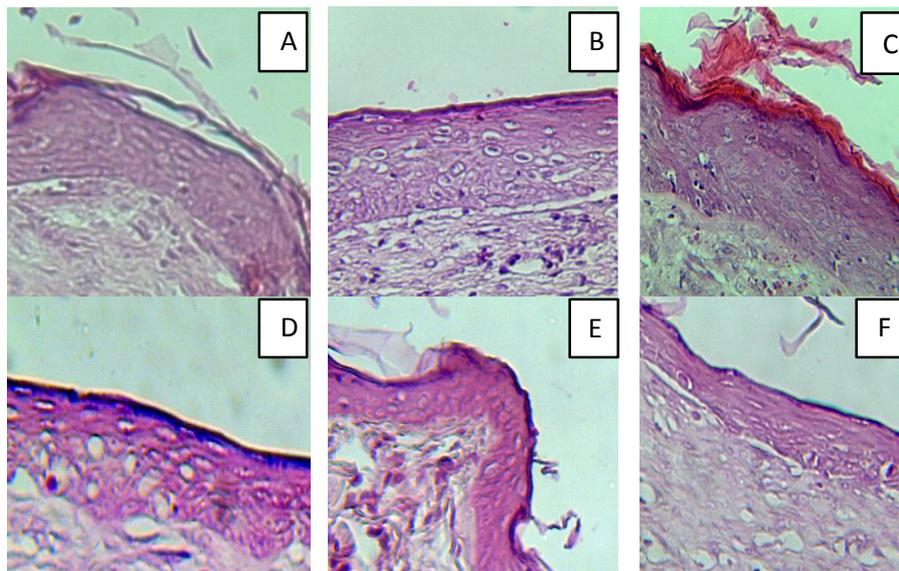
Tabel 1. Rata-rata Jumlah Fibroblas pada Luka Bakar Kimia

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Jumlah Fibroblas
Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan)	58,93 ± 4.83 sel a
Kontrol Negatif (Vaselin)	62,47 ± 4.85 sel c
Kontrol Positif (Bioplacenton®)	57,93 ± 4.89 sel a
Salep Chitosan 1,25 %	52,63 ± 7.00 sel b
Salep Chitosan 2,5 %	52,57 ± 6.80 sel b
Salep Chitosan 5 %	49,80 ± 6.01 sel b

Ket: angka yang diikuti huruf yg berbeda memiliki perbedaan yang signifikan



Gambar 1. Gambaran Histologi Jumlah Fibroblas: A. Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan); B. Kontrol Negatif (Basis Salep); C. Kontrol Positif (Bioplacenton®); D. Salep Kitosan 1,25 %; E. Salep Kitosan 2,5 %; F. Salep Kitosan 5 %. Kelompok Salep Kitosan 5 % Menunjukkan Jumlah Fibroblas Paling Sedikit (HE, 40x10).



Gambar 3. Gambaran histologi epitel kulit (pipih berlapis): A. Kontrol negatif (tanpa perlakuan); B. Kontrol negatif (basis salep); C. Kontrol positif (Bioplacenton®); D. Salep Kitosan 1,25 %; E. Salep Kitosan 2,5 %; F. Salep Kitosan 5 %. Kelompok salep kitosan 5 % menunjukkan ketebalan epitel paling tipis (HE, 40X10).

Tabel 2. Rata- Rata Ketebalan Epitel pada Luka Bakar Kimiawi

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ketebalan Epitel
Kontrol Negatif (Tanpa Perlakuan)	19.13 ± 3.50 μm <sup>a,b,c</sup>
Kontrol Negatif (Vaselin)	17.28 ± 1.24 μm <sup>a,c,d</sup>
Kontrol Positif (Bioplacenton®)	23.00 ± 4.70 μm <sup>b</sup>
Salep Chitosan 1,25 %	20.67 ± 2.04 μm <sup>b,c</sup>
Salep Chitosan 2,5 %	13.76 ± 1.06 μm <sup>a,d</sup>
Salep Chitosan 5 %	13.31 ± 4.05 μm <sup>d</sup>

Ket: angka yang diikuti huruf yg berbeda memiliki perbedaan yang signifikan

Gambar 2. menunjukkan penampakan jaringan kulit yang sudah sembuh ditiap kelompok dengan pengecatan HE. Gambar tersebut digunakan untuk menghitung rata-rata ketebalan epitel.

## DISKUSI

Penelitian ini menghitung fibroblas di akhir penyembuhan luka, jumlah fibroblas kelompok kitosan 5 % paling sedikit dan berbeda bermakna dibanding kontrol negatif dan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa proses eliminasi fibroblas terjadi lebih awal dari kelompok kontrol karena kitosan telah mengakselerasi induksi fibroblas lebih cepat di awal fase proliferasi. Data tersebut didukung oleh

beberapa penelitian yang menyebutkan bahwa fibroblas mencapai jumlah tertinggi pada hari ke-14 setelah terjadi luka kemudian lama kelamaan menurun di hari-hari berikutnya.<sup>8</sup>

Fase awal penyembuhan luka yang biasa disebut juga fase inflamasi, proses ini melibatkan berbagai sitokin, sel darah, matriks ekstraseluler, dan sel parenkim untuk membersihkan jejas, kemudian membangun dasar (*scaffolding*) secara progresif.<sup>9</sup> Fase inflamasi merangkai proses biologi yang diawali dengan platelet-induced hemostasis, diikuti oleh influks sel-sel inflamasi dan fibroblas untuk menuju area luka, pembentukan pembuluh darah baru, serta proliferasi sel-sel untuk rekonstitusi jaringan. Mekanisme peradangan menghasilkan respon yang menetralsasi dan mengeliminasi antigen seperti bakteri, benda asing atau sel mati. Selanjutnya adalah stadium proliferasi, pembentukan jaringan granulasi yang diperankan oleh fibroblas mengambil peranan besar dalam stadium ini, pengerutan luka dan epitelialisasi hingga menutup

seluruh permukaan luka berlangsung 4 hari - 4 minggu.<sup>6</sup> Pada minggu pertama fibroblas dihasilkan oleh derivat makrofag yaitu sitokin TGF- $\beta$ 1, PDGF dan fibroblast growth factor (FGF) untuk memproliferasi dan mensintesa glikosaminoglikan, proteoglikan dan kolagen yang berfungsi untuk merekonstruksi jaringan.

Penelitian Chiba *et al.* (2006),<sup>10</sup> menunjukkan bahwa hewan percobaan yang diberi kitosan memiliki resolusi neovaskularisasi yang lebih memadai, induksi fibroblas yang lebih cepat, dan serat kolagen yang lebih banyak. Hal ini didukung dengan penelitian Masuoka *et al.* (2005),<sup>11</sup> yang menyatakan bahwa kitosan memiliki kemampuan untuk meningkatkan paruh waktu basic Fibroblast Growth Factor dibanding kelompok kontrol dengan cara melindunginya agar tidak terdegradasi oleh panas atau enzim-enzim yang mungkin merusaknya. *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) atau disebut juga FGF-2 adalah salah satu prototipe *Fibroblast Growth Factor* (FGF) yang memiliki pengaruh amat besar terhadap perkembangan jaringan granulasi, proliferasi fibroblas dan angiogenesis. BFGF diaktifasi dari ECM apabila terjadi kerusakan jaringan seperti luka.<sup>12</sup> Fibroblas luka memiliki karakteristik unik dibanding fibroblas dalam jaringan normal, tampilannya myofibroblastik dengan ciri-ciri fenotif berupa filamen-filamen kontraktil berlimpah, persimpangan interselular yang rapat dan membran nukleus yang nampak berbeda.<sup>13</sup>

Seperti halnya penelitian Sezer (2007),<sup>14</sup> epitel yang lebih tipis lebih baik karena pada epitel yang tebal masih terjadi proses stimulasi populasi fibroblas pada daerah luka dan peningkatan sejumlah growth factor atau mediator dengan demikian penyembuhan luka yang lebih sempurna adalah

jaringan yang memiliki ketebalan epitel yang paling tipis. Diantara kelompok salep kitosan yang terbaik dalam menyembuhkan luka adalah salep kitosan 5% karena memiliki ketebalan epitel yang paling tipis dan perbedaannya signifikan dibanding kontrol negatif.

Lapisan epitel mengalami puncak ketebalan pada hari ke- 14 kemudian menipis pada hari-hari berikutnya.<sup>15</sup> Peningkatan ketebalan epitel yang mencapai puncaknya di hari ke-14 disebabkan oleh fibroblas yang banyak bermigrasi pada area luka khususnya di hari ke 7-14 dan perlekatan antara kolagen-fibroblas di tepi epitel luka.<sup>14</sup> Proses tersebut menyebabkan epitel semakin menebal agar lebih kuat dalam mengkerutkan dan menutup luka bersama-sama dengan fibroblas-kolagen. Fibroblas mulai meninggalkan area luka bersamaan dengan proses reepitelisasi yang terbentuk sempurna dan aktivasi kolagen yang memulai fase maturasi.

Fase proses penyembuhan yang terakhir adalah fase maturasi. Pada stadium ini, pembentukan pembuluh darah ke daerah luka semakin berkurang, mulai terbentuk serat-serat kolagen, dan luka tampak sebagai jaringan parut berwarna pucat. Remodelling unsur parenkim untuk mengembalikan fungsi jaringan dan remodeling unsur jaringan ikat untuk memperoleh ketahanan jaringan yang lebih kuat.<sup>9</sup>

## SIMPULAN

Kitosan berpengaruh pada ketebalan epitel dengan dosis terbaik adalah salep kitosan 5 % yang memiliki ketebalan epitel paling tipis ( $13.31 \pm 4.05$ ) dan nilai signifikansi ( $p=0,015$ ). Pengaruh pemberian salep kitosan terhadap penyembuhan luka bakar kimia yang paling signifikan berdasarkan

parameter jumlah fibroblas adalah kelompok salep kitosan 5% dengan jumlah fibroblas sedikit ( $49,80 \pm 6.01$ ) dan nilai signifikansi ( $p=0,000$ ).

Diperlukan penelitian sejenis dengan metode observasi per minggu untuk mengetahui progresi ketebalan epitel dan fibroblas dari waktu ke waktu. Penelitian lebih lanjut diharapkan memberikan pengetahuan tentang ekspresi mediator inflamasi FGF, MMP dan pembentukan matriks ekstraselluler, untuk memperjelas peran kitosan terhadap mediator serta proses tersebut. Selain itu, uji sensitifitas kitosan pada kulit manusia sangat baik jika turut diteliti.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Sularsito, S.A., & Djuanda, S. *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin: Dermatitis*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. 2007.
2. Departemen Kesehatan RI. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007: Laporan Nasional. Jakarta. 2008.
3. Moenajat, S.B. *Luka Bakar dan Penanganannya*. Jakarta: Balai penerbit FKUI. 2003.
4. Huttenlocher, A., & Horwitz, A.R. Wound Healing with Electric Potential. *N Engl J Med*. 2007; 356 (3): 303-304.
5. Ishihara, M., Nakanishi, K., Ono, K., Sato, M., Kikuchi, M., Saito, Y., *et al*. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, 2002. 23 (3): 833-840.
6. Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. *Pathologic Basic of Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders Inc, 2005. 25 – 30.
7. Wardono, A. *Pengaruh Kitosan Secara Topikal Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimiawi pada Kulit Tikus Putih (Rattus Novergicus) Terinduksi Asam Sulfat*. KTI. Program Sarjana Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta. 2009.
8. Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM. Cutaneous Wound Healing: Myofibroblastic Differentiation and in vitro Models. *Int J Low Extrem Wounds*. 2003; 2 (2): 60-68.
9. Bisono, P. *Luka, Trauma, Syok dan Bencana*. Dalam: Syamsuhidajat R, Jong WD ed Buku Ajar Ilmu Bedah, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2009.
10. Chiba, Y., Kamada, A., Sugashima, S., Taya, K., Matsubuchi, S., Saito, T., *et al*. Effects of Intravenous Administration of Chitosan Oligosaccharide on The Wound Healing Process of Oral Mucosal Injury in Mice. *Ohu University Dental Journal*, 2006; 33 (4): 207-213.
11. Masuoka K, Ishihara M, Asazuma T, Hattori H, Matsui T, Takase B, *et al*. 2005. The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. *Biomaterials*, 2005; 26 (16): 3277-3284.
12. Fu X, Li X, Cheng B, Chen W, Sheng Z. Engineered Growth Factors and Cutaneous Wound Healing Success and Possible Question in the Past 10 Years. *Wound Rep Regen*. 2005; 13 (2): 122-130.
13. Hosgood, G. *Small Animal Paediatric Medicine and Surgery*. USA: Butterworth-Heinemann. 1998.
14. Sezer A. D., Hatipolu F., Cevher E., Ourtan Z., Ba\_ A. L., Akbua J. Chitosan Film Containing Fucoidan as a Wound Dressing for Dermal Burn Healing: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2007; 8 (2):39.

- 15 Aryenti. *Pengaruh Pemberian Getah Batang Pisang Ambon (Musa Paradisiaca var Sapientum Lamb) Terhadap penyembuhan Luka Bakar pada Kulti Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Tesis. Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 2008.