

# **PENGARUH PEMBERIAN +*dalethyne* TERHADAP JUMLAH FIBROBLAST PADA LUKA PUNGGUNG TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINFEKSI *Pseudomonas aeruginosa***

Waode Fifin Ervina<sup>1</sup>, Agung Dwi Wahyu<sup>2</sup>, Yoes Pijatna Dachlan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Doktor FK, Universitas Airlangga,

<sup>2</sup>Staff Pengajar, Program Studi Kedokteran, FK, Universitas Airlangga

**Abstract: Effect treatment of + *Dalethyne* on Amount of White Rat Fibroblast (*Rattus norvegicus*) Infected by *Pseudomonas aeruginosa*.** One of nosocomial pathogen that can infect patients treated in the hospital is *Pseudomonas aeruginosa*. Some studies show that the increased incidence of infection by *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients followed by an increase in the incidence of resistance to various antibiotics. One compound that is claimed to kill bacteria in nosocomial infection and accelerate wound healing of the skin is +*dalethyne*. +*dalethyne* is the fractional content of the olive oil into new substances include aldehyde, palmitic acid, stearat acid, oleic acid, linoleic acid and myristicine. This study aimed to describe the role of +*dalethyne* on wound healing in nosocomial infections. This experimental research manifold specifically the number of fibroblasts with hematoxylin eosin method. The results obtained are: The provision of topical +*dalethyne* tends to increase the number of fibroblasts on day 4 (256) and decreased on day 6 (118), due to differences in behavioral and physiological groups of mice on 4th and 6th day.

**Keywords:** Fibroblast, aldehydes, Wound Healing

**Abstrak: Pengaruh Pemberian +*dalethyne* Terhadap Jumlah Fibroblast Pada Luka Punggung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa*.** Salah satu patogen nosokomial yang dapat menginfeksi pasien yang di rawat di rumah sakit adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa peningkatan insiden infeksi oleh *Pseudomonas aeruginosa* pada pasien rumah sakit diikuti pula oleh peningkatan kejadian resistensi terhadap berbagai antibiotik. Salah satu senyawa yang diklaim dapat membunuh bakteri pada infeksi nosokomial dan mempercepat penyembuhan luka pada kulit ialah +*dalethyne*. +*dalethyne* adalah pecahan kandungan minyak zaitun menjadi zat baru antara lain aldehyde, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan myristicine. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan peran +*dalethyne* terhadap penyembuhan luka pada infeksi nosokomial. Penelitian yang berjenis eksperimental ini secara spesifik mengamati jumlah fibroblast dengan metode hematoxylin eosin. Hasil yang diperoleh yaitu Pemberian topikal +*dalethyne* cenderung meningkatkan jumlah fibroblast pada hari ke 4 (256) dan menurun pada hari ke6 (118), disebabkan oleh perbedaan perilaku dan fisiologis tikus pada tikus kelompok hari ke4 dan ke6.

**Kata Kunci :** Fibroblast, Aldehyd, Penyembuhan Luka

## **PENDAHULUAN**

Infeksi nosokomial sampai sekarang masih merupakan masalah perawatan kesehatan di rumah sakit seluruh dunia. Menurut catatan WHO tahun 2016, di negara maju tercatat 7

kasus dari 100 penderita yang masuk rumah sakit terkena nosokomial, sedangkan di negara berkembang terdapat 10 kasus dari 100 pasien yang ada di rumah sakit. Sementara di tahun 2013, terdapat penelitian yang

menunjukkan bahwa lebih dari 20% dari infeksi nosokomial terjadi di Ruang ICU dan menjadi penyebab utama kematian pada pasien khususnya yang terbaring di ICU (Kemenkes RI, 2014).

Salah satu patogen nosokomial yang dapat menginfeksi penderita yang di rawat di rumah sakit adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Infeksi yang terjadi berupa pneumonia, infeksi pada mata, infeksi pada luka bakar atau luka bedah, infeksi kulit, infeksi saluran kemih, bakteremia dan septicemia. Target utama bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah pasien fibrosis kistik, jaringan basah seperti membran mukosa atau area di sekitar kulit yang terjadi *injury*. Apabila lambat ditangani maka infeksi ini akan menyebabkan kerugian yaitu lamanya rawat inap yang tentunya akan membutuhkan biaya yang lebih banyak dari perawatan normal bila tidak terkena infeksi nosokomial bahkan bisa menyebabkan septinemia atau kematian (Ramos, 2004).

Seperti yang diketahui bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri intraseluler sehingga dalam pemusnahannya perlu adanya peningkatan molekul yang dapat meningkatkan aktivasi bakterisidal pada makrofag dan untuk mempercepat penyembuhan luka juga dibutuhkan senyawa yang dapat menstimulus pembentukan jaringan baru di kulit. Pada penelitian sebelumnya oleh Darshan (2016), menemukan senyawa baru yang dikenal dengan *+dalethyne* yaitu merupakan pecahan kandungan minyak zaitun menjadi zat baru yaitu aldehyde, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan myristicine. Zat-zat baru tersebut diklaim dapat membunuh bakteri pada infeksi nosokomial dan mempercepat penyembuhan luka pada jaringan kulit.

Dengan pemberian *+dalethyne* yang mengandung aldehyde yang memiliki fungsi sebagai anti-inflamasi diharapkan dapat meregulasi sitokin proinflamatori yang meningkat dengan cara menghambat degradasi NFkB dan

menginduksi IL-10. Selain itu juga dapat berfungsi sebagai anti bakteri dengan cara melisis dinding sel pada bakteri. Kandungan lain seperti asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan myristicine dapat berperan dalam proses membunuh bakteri dengan memproduksi ROS (*reactive oxygen species*) dan membantu proses pembunuhan bakteri sehingga dengan begitu proses penyembuhan luka dipercepat dengan mengetahui peningkatan jumlah fibroblast yang dihasilkan yang akan membentuk matriks ekstraseluler dalam pembentukan jaringan baru.

Dengan begitu perlu diadakannya penelitian ini untuk menguji pengaruh *+dalethyne* dalam membunuh bakteri dan meregulasi sel-sel imun dan membantu proses penyembuhan luka dengan melihat jumlah fibroblast jaringan kulit baru yang terbentuk setelah *injury*.

## METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni laboratorium (*True Ekperimental*) menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design* (pengambilan data dilakukan setelah dilakukan perlakuan) dan kemudian dibandingkan pada masing-masing kelompok. Objek penelitian ini yaitu tikus galur wistar (*Rattus Novergicus*) dengan jumlah masing-masing kelompok perlakuan 6 ekor. Sehingga jumlah keseluruhan tikus yang dikorbankan yaitu 36 ekor tikus. Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *+dalethyne* terstandar. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* dengan suspensi  $1,5 \times 10^8$  sel/ml yang didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi RSUD. Dr. Soetomo, Surabaya. Penelitian dilaksanakan di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk pemberian perlakuan pada hewan coba dan di Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk pemeriksaan *Haematoxylin Eosin*.

Penelitian ini menggunakan tikus yang diberi luka insisi pada daerah punggung sebesar 2 cm dengan kedalaman luka hingga mencapai daerah dermis kulit. Beberapa perbedaan perlakuan pada masing-masing kelompok yaitu: (1) kelompok tikus diberi luka, tikus diberi luka punggung kemudian diamati jaringan luka dengan melihat jumlah fibroblast pada hari ke 4 dan hari ke 6. (2) kelompok tikus diberi luka+bakteri, tikus diberi luka punggung kemudian dibiarkan beberapa menit ( $\pm 5$  menit) untuk terjadinya proses homeostasis lalu diinfeksi *P.aeruginosa* sebanyak 50 microliter, kemudian diamati jaringan luka dengan jumlah fibroblast pada hari ke 4 dan hari ke 6. (3) kelompok tikus diberi luka+bakteri+*dalethyne*, tikus diberi luka punggung kemudian dibiarkan beberapa menit ( $\pm 5$  menit) untuk terjadinya proses homeostasis lalu diinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* sebanyak 50 microliter, ditunggu sekitar 48 jam kemudian diberikan +*dalethyne*,

lalu diamati jaringan luka dengan melihat jumlah fibroblast pada hari ke 4 dan hari ke 6.

Metode analisis data menggunakan hasil perbandingan nilai mean (rerata) antar kelompok. Jumlah fibroblast yang positif yaitu sel fibroblast tercatat berwarna keunguan Metode analisis data menggunakan hasil perbandingan nilai median antar kelompok.

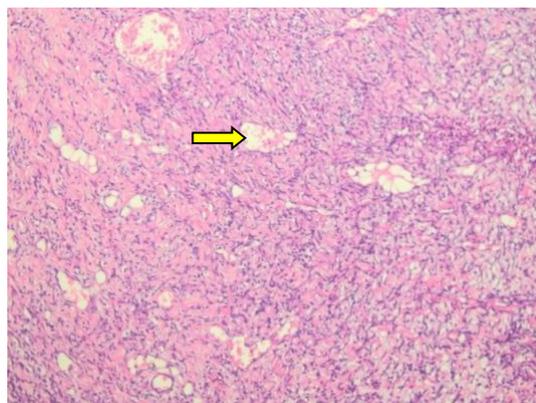
## HASIL

### Analisis Data dan Jumlah Fibroblast

Data penelitian untuk jumlah fibroblast dihitung pada pembesaran 200x dan 400x mikroskop cahaya dari setiap preparat jaringan yang telah diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxilin Eosin*. Pengamatan dilakukan 10 lapang pandang, setiap lapang pandang diamati dan dihitung sel fibroblast dengan karakteristik berukuran besar, berbentuk oval dan sitoplasma terwarnai ungu (tabel 1).

**Tabel 1. Hasil distribusi data jumlah sel fibroblast hari ke4**

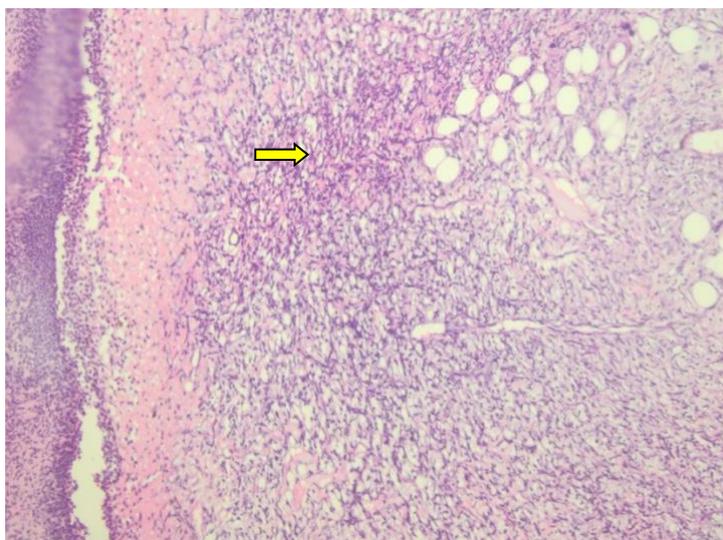
	N	Luka+infeksi	Luka	Luka+infeksi+ <i>dalethyne</i>
Mean $\pm$ SD	6	70 $\pm$ 15	88 $\pm$ 79	195 $\pm$ 95
Median	6	75	46	256
Min-Max	6	50-90	40-260	25-270



Gambar 1. Preparat hari ke 4 jaringan kulit tikus *Rat norvegicus* yang diberi luka+infeksi *P.aeruginosa* + *dalethyne* pembesaran 200x HE terlihat bentuk sel fibroblast (besar dan pipih) ditandai anak panah kuning.

**Tabel 2. Hasil distribusi data jumlah sel fibroblast hari ke6**

	N	Luka+infeksi	Luka	Luka+infeksi+ <i>dalethyne</i>
Mean $\pm$ SD	6	211 $\pm$ 82	110 $\pm$ 124	133 $\pm$ 84
Median	6	195	46	118
Min-Max	6	110-370	0-350	38-250



Gambar 2 preparat hari ke 6 jaringan kulit tikus *Rat norvegicus* yang diberi luka+infeksi *P.aeruginosa* + *dalethyne* pembesaran 200x HE terlihat bentuk sel fibroblast (besar dan pipih) ditandai anak panah kuning

## PEMBAHASAN

Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang didapatkan oleh seseorang selama masa perawatan atau pemeriksaan di rumah sakit dalam waktu 3x24 jam sejak mereka masuk rumah sakit tanpa adanya tanda-tanda infeksi sebelumnya (Depkes, 2003). Penularan dapat terjadi melalui cara silang (*cross infection*) dari satu pasien ke pasien yang lainnya yang telah terinfeksi mikroorganisme atau infeksi diri sendiri yang mikroorganisme sudah ada pada pasien kemudian melalui suatu migrasi (gesekan atau sentuhan) pindah tempat dan ditempat baru menyebabkan infeksi. Tidak hanya pasien rawat yang dapat tertular tetapi seluruh personil rumah sakit yang berhubungan dengan pasien.

Saat ini dilaporkan beberapa antibiotik resisten terhadap bakteri *P. aeruginosa* seperti golongan  $\beta$ -lactam, ciprofloxacin, tobramycin dan colistin (Rehm, 2008). Sejak berabad-abad tahun yang lalu telah menggunakan ekstrak minyak dari tanaman aromatik dan tanaman herbal untuk pengobatan tradisional dalam mengobati penyakit infeksi, hal ini disebabkan oleh fungsi

antimikrobal dari tanaman herbal tersebut (Parsaeimehr, *et al*, 2013). *+dalethyne* merupakan senyawa baru yang berasal dari ekstrak minyak zaitun yang memiliki komposisi seperti aldehide dan myristicine yang berfungsi sebagai antimikroba.

Dikatakan bahwa antara fase inflamasi dan proliferasi terjadi *overlapping*, yang fase inflamasi terjadi sesaat terjadi luka sampai 5 hari dan fase proliferasi terjadi pada hari 3-14. Jumlah fibroblast pada fase proliferasi mencapai puncaknya pada hari ke-7. Peningkatan jumlah fibroblast pada daerah luka merupakan kombinasi dari proliferasi dan migrasi.

Melalui analisis data perhitungan dengan membandingkan nilai median pada hari ke 4 nilai yang tertinggi hingga terendah yaitu kelompok tikus yang diberi luka+infeksi+*dalethyne* (256), kemudian kelompok tikus diberi luka+infeksi (75) dan terakhir kelompok tikus yang hanya diberi luka (46,5). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah fibroblast pada kelompok tikus yang diberi luka+infeksi+*dalethyne* telah menunjukkan peningkatan yang diketahui bahwa jumlah IL-1 $\beta$  pada hari ke-4 yaitu (29,5) lebih rendah

dibandingkan kelompok tikus diberi luka+infeksi dan tikus hanya diberi luka. seperti dikatakan bahwa fase inflamasi dan proliferasi terjadi *overlapping*. Fibroblast merupakan sel yang dapat berfungsi sebagai parakrin dan autokrin, karena dapat mengirimkan sinyal parakrin seperti IGFBP-3 dan -5, IGF-II, *connective tissue growth factor* (CTGF), IL-33, kemokin CXCL, kemokin CC dan *reactive oxygen species* (ROS). CTGF memiliki peran yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka, angiogenesis dan fibrosis. CTGF sangat kuat diekspresikan oleh sel fibroblast dan sel endothelial. CTGF dapat berikatan dengan berbagai macam reseptor, ligan ekstraselular dan protein ECM. Fibroblast yang mengirimkan sinyal autokrin seperti TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. Fungsi TGF $\beta$  yaitu dapat mengubah fibroblast menjadi myofibroblast selain itu dapat meningkatkan proliferasi, migrasi dan produksi matriks. Selain itu juga makrofag dapat melepaskan PDGF (platelet-derived growth factor) dan FGF (fibroblast growth factor) yang juga dapat menstimulasi fibroblast untuk berproliferasi, migrasi ke daerah luka dan mensintesis glycosaminoglycans, proteoglycans dan kolagen untuk pembentukan ECM.

Pada hari ke 6 perbandingan nilai median jumlah fibroblast yang paling tinggi hingga secara berturut-turut yaitu pada kelompok tikus yang diberi luka+infeksi (195), kemudian kelompok tikus yang diberi luka+infeksi+*dalethyne* (118,5) dan terakhir kelompok tikus yang diberi luka (46,5). Terjadi penurunan pada kelompok tikus yang diberi luka + infeksi + *dalethyne*, dari hari ke4 ke hari ke6. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor yaitu perbedaan tikus yang diamati hari ke4 dan hari ke 6, selain karena tikus tersebut diinfeksi bakteri *P.aeruginosa* yang memiliki superantigen, terdapat juga pengaruh lain yaitu perilaku masing-masing tikus saat di dalam kandang berbeda misalnya antar tikus saling menindih satu sama lain, sehingga daerah lukapun kemungkinan ikut terkontaminasi oleh mikroorganisme

lain sehingga menyebabkan masa inflamasi bertambah panjang dan proses pembentukan fibroblast baru mulai meningkat pada hari ke6. Hal ini sejalan dengan perhitungan jumlah IL-1 $\beta$  yang ikut meningkat pada hari ke6. Sama halnya dengan kelompok tikus yang diberi luka+infeksi, terjadi pemanjangan inflamasi. Namun jumlah fibroblast pada hari ke 6 meningkat dibandingkan hari ke4, mengindikasikan bahwa proses inflamasi masih berlangsung dan terjadi *overlapping* dengan proses fibroblast. Berbeda halnya dengan kelompok tikus yang hanya diberi luka, terlihat bahwa perbandingan nilai median antara hari ke4 dan hari ke6 adalah sama yaitu 46,5. Pengamatan secara makroskopis baik kelompok tikus hari 4 dan hari 6 terlihat beberapa tikus telah menunjukkan penyembuhan dengan luka tertutup rapat. Diindikasikan bahwa fibroblast telah memacu proses epitelisasi oleh keratinosit, dengan begitu kelompok ini mengalami epitelisasi lebih cepat dibandingkan kelompok lainnya, selain itu juga fibroblast mensekresi KGF (keratinocyte growth factor) yang berkontribusi dalam proses re-epitelisasi.

## KESIMPULAN

Pemberian topikal *dalethyne* dapat meningkatkan jumlah fibroblast pada hari ke 4 dan menurun pada hari ke6, disebabkan oleh perbedaan perilaku dan fisiologis tikus pada tikus kelompok hari ke4 dan ke6.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, Abul K; Andrew H. Lichtman dan Shiv Pillai. (2015). *Cellular and Molecular Immunology, edisi 8*. Elsevier Saunders. Philadelphia.
- Acuto, et al., editor Kenneth Murthy dan Casey Weaver. (2017). *Janeway's Immunobiology edisi 9*. Garland Science, New York and London.
- Akira, et al., editor Kenneth Murthy dan Casey Weaver. (2017). *Janeway's Immunobiology edisi 9*. Garland Science, New York and London.

- Akram, et al., (2016). *Selective inhibition of JAK2/STAT1 signaling and iNOS expression mediates the anti-inflammatory effects of coniferyl aldehyde*. *ChemicoBiological Interactions*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.029>.
- Alouf, Joseph; Daniel dan Michael. (2015). *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Elsevier.
- Andersson dan Nettelblad. (2009). *From Basic Wound Healing to Modern Skin Engineering*. N. Hakim (ed.), *Artificial Organs, New Techniques in Surgery Series 4*, DOI 10.1007/978-1-84882-283-2\_6.
- Buckley, et al., (2001). *Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation*. *TRENDS in Immunology* Vol.22 No.4 April 2001.
- Depkes RI. (2003). *Infeksi Nosokomial*. Jakarta : Depkes RI.
- Diegelmann dan Melissa, (2004). *Wound Healing: An Overview Of Acute, Fibrotic And Delayed Healing*. *Frontiers in Bioscience*. 9,283-289, January1.
- Duval et al., (2002). *Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase*. *Biochem. J.* (2002) 367, 889±894.
- Enzerink dan Vaheri., (2011). *Fibroblast activation in vascular inflammation*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9: 619-626.
- Hartupée dan Douglas. (2015). *Role of inflammatory cells in fibroblast activation*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. YJMCC-08249; No. of pages: 6; 4C.
- Heiniger, et al. (2010). *Infection of Human Mucosa Tissue and By Pseudomonas aeruginosa requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesion*. *Departement of Microbiology and Immunology. Cellular Mikrobiology*. 12(8),1158-1173.
- Kendall dan Carol. (2015). *Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators*. *Frontiers in*, doi: 10.3389/fphar.2014.00123.
- Kemenkes RI. (2014). *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2014*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Rai, Mahendra Kumar. (2013). *Fighting Multidrug Resistance With Herbal Extracts, Essential Oils And Their Components*. Academic Press is an Imprint of Elsevier.
- Ramos. (2004). *Pseudomonas Volume 1 Genomics, Life Style and Molecular Architecture*. Springer Science+Business Media New York.
- Rehm. (2008). *Pseudomonas Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Sutterwala, et al., (2007). *Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome*. Vol. 204, No. 13, December 24, 2007 3235-3245.
- Velnar, Bailey dan Smrkolj. (2009). *The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms*. *The Journal of International Medical Research*. 2009; 37: 1528 – 1542 [first published online as 37(5) 12].
- Wei, et al. (2010). *Anti-inflammatory Effect of Protocatechuic Aldehyde on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo and In Vitro*. DOI: 10.1007/s10753-012-9581-z.
- Yao, et al. (2015). *Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes*. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2146.
- Zhang, J., Xu, K., Ambati, B., and Yu, F. S. (2003). *TLR modulation P.aeruginosa*. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44,4247-4254.