

LAPORAN PENELITIAN

Perbedaan Pengaruh Pemberian Kitosan Berat Molekul Tinggi dan Rendah terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Proses Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi

(The Difference Effect of High and Low Molecular Weight Chitosan to The Amount of Blood Vessel in Wound Healing Process of Dental Extraction)

Bella Sagita Puspita*, Sularsih**, Dian W. Damaiyanti***

*Sarjana Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

**IMTKG Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

***Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

ABSTRACT

Background: Molecular weight is one of the chitosan characteristic that affects the effectiveness of application for wound healing in dental extraction. Chitosan could improve wound healing process because of its anti inflammation component and accelerate proliferation phase. Angiogenesis is one of the main component in proliferation phase because it can preserve cells function to accelerate wound healing process. **Purpose:** the aim of this experiment is to account blood vessels in wound healing of dental extraction using chitosan with different molecular weight. **Materials and Methods:** Thirty six male *Rattus Norvegicus* were divided into 3 groups. Group I (without chitosan), group II was given low molecular weight chitosan, group III was given high molecular weight chitosan. Rats were sacrificed on day 7 and on day 14 post extraction then they were examined by hystometri to see the change in blood vessels number. **Result:** Data were statistically analyzed with One Way ANOVA and LSD with degree of significant $p < 0,05$ showed significant difference between high molecular weight chitosan group and low molecular weight chitosan group after 7 and 14 days observation. **Conclusion:** High molecular weight chitosan was found more effective to increase blood vessels amount at 7th day and decrease blood vessels amount at 14th day in wound healing of dental extraction process.

Keyword: Chitosan, molecular weight, angiogenesis, wound healing

Correspondence: Sularsih, Department of Materials science and Technology Dentistry, Faculty of Dentistry, Hang Tuah University, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Phone 031-5945864, 5912191, Email: l4rs_dentist@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Berat molekul merupakan salah satu karakteristik dari kitosan yang mempengaruhi efektifitas aplikasi untuk penyembuhan luka pencabutan. Kitosan dapat menunjang proses penyembuhan luka karena dapat sebagai anti-inflamasi dan mendukung tahapan proliferasi. Angiogenesis merupakan salah satu komponen utama dalam fase proliferasi karena dapat mempertahankan fungsi berbagai jaringan untuk mempercepat proses penyembuhan luka. **Tujuan:** Mengetahui perbedaan pengaruh antara kitosan berat molekul rendah dan tinggi terhadap jumlah pembuluh darah pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi. **Bahan dan Metode:** Tiga puluh enam *Rattus Norvegicus* jantan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok I adalah kelompok kontrol (tanpa kitosan), kelompok II diberi kitosan gel berat molekul rendah, kelompok III diberi kitosan gel berat molekul tinggi. Dilakukan pengambilan mandibula tikus dan decaputasi pada hari ke-7 dan ke-14 kemudian dibuat sediaan histopatologi untuk melihat jumlah pembuluh darah. **Hasil:** Analisa statistik One Way ANOVA dan LSD dengan derajat kemaknaan $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kitosan berat molekul tinggi dan rendah pada pengamatan hari ke-7 dan ke-14. **Simpulan:** Kitosan berat molekul tinggi lebih efektif terhadap kenaikan jumlah pembuluh darah pada hari ke-7 dan penurunan jumlah pembuluh darah hari ke-14 pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi.

Kata kunci: kitosan, berat molekul, angiogenesis, penyembuhan luka

Korespondensi: Sularsih, Bagian Ilmu Material dan Teknologi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Telepon 031-5945864, 5912191, Email: l4rs_dentist@yahoo.com

PENDAHULUAN

Angiogenesis merupakan salah satu komponen utama pada fase proliferasi karena dapat mempertahankan fungsi berbagai jaringan dengan memberikan suplai nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan untuk penyembuhan luka.¹ Pada penyembuhan luka paska pencabutan gigi akan terjadi proses fisiologis penyembuhan luka terdiri dari 4 fase, yaitu fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling.²

Angiogenesis merupakan proses penyembuhan luka yang terjadi pada fase proliferasi, dimulai pada hari ke-3 sampai hari ke-7 dan mulai berkurang pada hari ke-10.³ Proses ini merupakan proses alami yang penting dan dibutuhkan pada penyembuhan luka untuk mengembalikan aliran darah

pada jaringan setelah terjadi luka, sehingga jaringan yang baru mendapatkan suplai nutrisi yang cukup untuk berproliferasi.^{4,5} Angiogenesis distimulasi dan diatur oleh berbagai sitokin yang kebanyakan dihasilkan oleh sel makrofag, sel fibroblas dan platelet. Beberapa sitokin yang penting diantaranya adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF) yang memiliki kemampuan untuk menginduksi semua tahap yang diperlukan bagi angiogenesis.⁶

Berbagai metode dikembangkan dalam penanganan luka untuk menghasilkan penyembuhan luka yang optimal, salah satunya adalah pendekatan penyembuhan luka menggunakan biomaterial. Kitosan merupakan biomaterial yang telah teruji dapat menunjang proses

penyembuhan luka.⁷ Kitosan memiliki sifat yang biokompatibel, *biodegradable*, tidak beracun, anti mikroba, dan *hydrating agent*, karena sifat ini, kitosan menunjukkan efek positif pada penyembuhan luka.⁸ Parameter yang berpengaruh pada sifat kitosan adalah berat molekul (BM) dan derajat deasetilasi (DD).⁹ Kitosan yang memiliki berat molekul tinggi maka viskositasnya tinggi, sedangkan kitosan yang memiliki berat molekul rendah maka viskositasnya juga rendah, karena semakin tinggi berat molekul maka ukuran partikelnya juga semakin besar sehingga proses pelarutan semakin lambat.¹⁰ Kitosan berat molekul tinggi memiliki sifat mukoadhesif yang baik dalam menutup luka.¹¹

Penelitian yang dilakukan Gunawan (2014) tentang pembuatan formulasi kitosan gel ditambah dengan NaOH untuk menetralkan pH sudah memenuhi kriteria pengaplikasian gel dalam rongga mulut, namun viskositasnya menjadi rendah sehingga sulit untuk diaplikasikan ke dalam rongga mulut.¹² *Sodium carboxymethyl cellulose* (Na-CMC) adalah salah satu bahan tambahan makanan berupa bahan penstabil yang berfungsi sebagai pengikat air dan pembentuk gel.¹³ Bahan ini merupakan zat dengan warna putih atau sedikit kekuningan, tidak berbau dan tidak berasa, berbentuk bubuk yang halus, tidak merubah pH dan meningkatkan viskositas larutan.¹⁴

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti ingin mengetahui pengaruh penggunaan kitosan yang memiliki berat molekul tinggi dan rendah yang ditambah dengan Na-CMC terhadap jumlah pembuluh darah pada hari ke-7 dan ke-14 dalam proses penyembuhan luka pencabutan gigi.

BAHAN DAN METODE

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah tikus jenis *Rattus Norvegicus strain Wistar* jantan, usia 3 bulan, berat badan 120-150 gram.

Sebanyak 36 ekor hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu, kelompok 1: kelompok kontrol tanpa diberi kitosan; kelompok 2 : kelompok perlakuan dengan kitosan gel berat molekul rendah; kelompok 3 : kelompok perlakuan dengan kitosan gel berat molekul tinggi. Pada tiap kelompok perlakuan, 6 ekor didekaputasi pada hari ke-7 dan 6 ekor lainnya didekaputasi pada hari ke-14 setelah pencabutan gigi.

Pembuatan kitosan gel mengacu pada penelitian pendahuluan, dengan melarutkan 1 gram bubuk kitosan dalam 100ml asam asetat 1% sehingga menjadi sediaan bentuk gel, kemudian ditetesi dengan larutan NaOH.¹⁵ Setelah itu ditambahkan Na-CMC untuk mendapatkan viskositas yang baik.

Prinsip kerja aseptis, semua alat disterilkan dengan panas kering 160°C selama 1 jam. Hewan coba dianestesi dengan ketamine dosis 25 mg/kg BB xylazine dosis 10mg/kg BB yang dilarutkan dalam larutan *isotonic saline solution* steril lalu diambil 0,2ml/200gram BB dan disuntikkan pada paha kanan atas secara intramuskular. Dilakukan pembersihan pada daerah pencabutan, selanjutnya dilakukan pencabutan gigi insisive kiri rahang bawah pada tikus menggunakan alat modifikasi tang elevator. Pastikan tidak ada sisa gigi yang tertinggal di dalam soket gigi. Soket gigi kemudian diirigasi menggunakan *saline solution*. Kitosan gel dengan berat molekul rendah dan

tinggi dalam *syringe* berdiameter kecil dimasukkan ke dalam soket tempat luka bekas pencabutan gigi sebanyak 0,1 ml/ ekor hewan coba, kemudian lukanya dijahit dengan teknik simpul tunggal menggunakan *absorbable sutures*.¹⁵ Tikus didekaputasi pada hari ke-7 dan ke-14, kemudian mandibular tikus difiksasi dengan buffer formalin, lalu didekalsifikasi dengan larutan EDTA, setelah itu dilakukan pengecatan dengan HE.

Pengamatan dan perhitungan jumlah pembuluh darah dilakukan dibawah mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan kamera. Pembesaran 100x untuk melihat semua lapangan pandang, kemudian ditingkatkan dengan pembesaran 400x. Perhitungan jumlah pembuluh darah berupa bentukan lumen yang dikelilingi selapis sel endotel diambil pada hari ke-7 dan ke-14 setelah pencabutan gigi. Daerah yang akan diamati ditentukan terlebih dahulu yaitu bagian tepi daerah sepertiga soket bekas pencabutan gigi yang berbatasan dengan tulang alveolaris.

Teknik analisa data yang dipakai untuk membandingkan pengaruh pemberian kitosan dengan berat molekul rendah dan tinggi terhadap perbedaan rerata jumlah pembuluh darah pada luka pencabutan gigi adalah *One Way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji LSD.

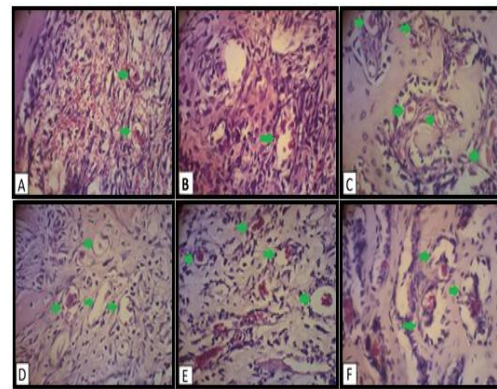
HASIL

Pada tabel 1 dan gambar 1 menunjukkan bahwa jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka pencabutan gigi paling banyak pada kelompok perlakuan dengan kitosan berat molekul tinggi pada pengamatan hari ke-7.

Data dari hasil penelitian dideskripsikan sebagai berikut :

Tabel 1. Rerata dan Simpang Baku Jumlah Pembuluh Darah dalam Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi

Kelompok	Rerata ± Simpang Baku
Kontrol hari ke-7	1,83 ± 0,753
Kontrol hari ke-14	2,00 ± 0,894
BM rendah hari ke-7	2,67 ± 0,816
BM Rendah hari ke-14	1,83 ± 0,753
BM tinggi hari ke-7	3,50 ± 1,049
BM tinggi hari ke-14	1,67 ± 1,211



Gambar 1 Gambar sedian histopatologi anatomi jumlah pembuluh darah pada 1/3 apikal soket pengamatan hari ke-7 dan ke-14 (pembesaran 400x) (A)Pembuluh darah pada kelompok kontrol hari ke-7, (B) Pembuluh darah pada kelompok berat molekul rendah hari ke-7, (C) Pembuluh darah pada kelompok berat molekul tinggi hari ke-7, (D) Pembuluh darah pada kelompok kontrol hari ke-14, (E) Pembuluh darah pada kelompok berat molekul rendah hari ke-14, (F) Pembuluh darah pada kelompok berat molekul rendah hari ke-14

Sebelum dilakukan uji hipotesis, maka setiap kelompok diuji normalitasnya dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, karena pada penelitian ini jumlah sampel tidak lebih dari 50. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data berdistribusi normal karena memiliki nilai $p > 0,05$.

Hasil data di atas diketahui memiliki distribusi data yang normal dan homogen. Oleh karena itu, uji dilanjutkan dengan menggunakan uji parametrik *One Way Anova*, yang digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pada tiap kelompok baik

secara terpisah maupun bersama-sama. Pada uji *Anova*, diperoleh nilai $p=0,014$ ($p<0,05$) yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan). Selanjutnya, untuk melihat perbedaan jumlah pembuluh darah masing-masing tiap kelompok perlakuan, maka dilakukan pengujian uji *LSD* dengan signifikansi $p<0,05$.

Hasil uji *LSD* pada kelompok kitosan berat molekul rendah dan tinggi hari ke-7 dan ke-14 ada perbedaan jumlah pembuluh darah tetapi perbedaannya tidak signifikan.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian didapatkan jumlah pembuluh darah pada hari ke-7 meningkat secara signifikan pada kelompok perlakuan dengan kitosan berat molekul rendah dan berat molekul tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kitosan mengandung *N-acetylglukosamine* yang dapat berikatan dengan FGF yang dapat menstimulasi angiogenesis,¹⁶ sehingga dengan pemberian kitosan ini pembuluh darah yang terbentuk lebih banyak dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi kitosan. Pada kelompok berat molekul tinggi jumlah pembuluh darah lebih banyak dibanding kelompok berat molekul rendah pada hari ke-7.

Pada kitosan berat molekul tinggi, ukuran partikel besar, viskositas lebih tinggi sehingga mukoadhesi lebih kuat, mudah melekat di jaringan dibanding dengan berat molekul rendah.¹⁷ Kitosan berat molekul tinggi memiliki monomer N-asetil yang lebih banyak dibanding kitosan berat molekul rendah.¹⁸ Monomer N-asetil glukosamin berikatan dengan reseptor utama pada makrofag untuk kitosan

yaitu *mannose reseptor*, setelah itu kitosan diinternalisasi oleh sel makrofag dan memicu migrasi dan proliferasi sel makrofag. Sel makrofag yang teraktivasi menghasilkan peningkatan aktivitas metabolik, sekresi *growth factor* seperti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), TGF (*Transforming Growth Factor*), dan Angiopoietin yang dapat menstimulasi pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis.^{1,18} Penelitian yang dilakukan Inan dan Serpil menyatakan bahwa kitosan dapat mempercepat penyembuhan luka dengan meningkatkan sekresi VEGF yang paling banyak pada hari ke-3, kemudian menurun pada hari ke-7, dan jumlahnya lebih sedikit pada hari ke-14.¹⁸

Jumlah pembuluh darah pada hari ke-14 terlihat lebih banyak pada kelompok kontrol, kemudian menurun secara signifikan pada kelompok perlakuan dengan kitosan. Hal ini sesuai dengan teori Kumar *et al* bahwa angiogenesis mulai berkurang pada hari ke-10. Ini merupakan salah satu tanda dimulainya fase remodeling.¹⁹ Pada kelompok kontrol jumlah pembuluh darah lebih banyak mungkin disebabkan karena pada kelompok kontrol masih mengalami proses penyembuhan sehingga masih dibutuhkan pembentukan pembuluh darah baru untuk suplai nutrisi dan oksigen untuk menunjang fase penyembuhan selanjutnya. Sedangkan pada kelompok perlakuan sudah mengalami proses penyembuhan ditandai dengan berkurangnya jumlah pembuluh darah. Pada kelompok perlakuan kitosan berat molekul tinggi dan berat molekul rendah pada hari ke-14 tidak berbeda signifikan mungkin dikarenakan pada pembuatan gel

kitosan berat molekul rendah dan tinggi viskositasnya dibuat sama. Oleh karena itu, pengaplikasian kitosan pada soket lebih mudah dan penetrasi pada lapisan mucin juga meningkat sehingga mukoadhesi lebih kuat, mudah melekat pada jaringan.¹⁷

SIMPULAN

Ada perbedaan pengaruh antara kitosan berat molekul rendah dan tinggi yang ditambah Na-CMC 0,5% terhadap jumlah pembuluh darah pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi. Pada hari ke-7 dan ke-14 ada perbedaan jumlah pembuluh darah pada kelompok berat molekul tinggi dan rendah tetapi perbedaannya tidak signifikan. Pada hari ke-7 jumlah pembuluh darah paling banyak pada kelompok kitosan berat molekul tinggi, kemudian jumlah pembuluh darah pada masing-masing kelompok perlakuan akan semakin menurun pada hari ke-14.

DAFTAR PUSTAKA

1. Frisca, Sardjono CT, Sandra F. 2009. Angiogenesis: Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. JKM, 8(2): 187-174.
2. Morison MJ. 2004. Seri Pedoman Praktis. Manajemen Luka. Jakarta : EGC. P. 7-1.
3. Asparini RR. 2011. Peran Heparin dalam Angiogenesis, Epitelisasi dan Penyembuhan Luka Bakar. Jurnal Sainika Medika, 2011, 7(14): 31-26.
4. Miloro M. 2004. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd edition. London: BC Decker Inc. P. 8-7.
5. William TD, Vincent W. 2003. Angiogenesis :A Control Point for Normal and Delayed Wound Healing. Supplement Contemporary Surgery:18-4.
6. Mitchell, Kumar, Abbas, Fausto. 2009. Dasar Patologis Penyakit Edisi 7. Andry Hartono (penerjemah), 2008. Jakarta: EGC. H. 57.
7. Budihargono O, Yuliati A, dan Rianti D. 2013. Peningkatan Mobilisasi Sel Polimorfonuklear Setelah Pemberian Gel Kitosan 1% pada Luka Pencabutan Gigi Cavia Cobaya. Material Dental Journal Universitas Airlangga. H. 1-6-1.
8. Ratnawati A, Djoni IR, Adri S. 2013. Sintesis dan Karakterisasi Kolagen dari Teripang-Kitosan sebagai Aplikasi Pembalut Luka. Available from <http://www.jurnal.unair.ac.id/filerPDF/jurnal%20AyuRatnawati.pdf>. Diakses 26 Maret 2014.
9. Wiyarsi A, dan Priyambodo E. 2010. Pengaruh Konsentrasi Kitosan dari Cangkang Udang terhadap Efisiensi Penyerapan Logam Berat. Available from <http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/penelitian/Erfan%20Priyambodo,%20M.Si./kitosan.PDF>. Diakses 4 April 2014.
10. Maeda Y, dan Kimura Y. 2004. Antitumor Effects of Various Low-Molecular-Weight Chitosans Are Due to Increased Natural Killer Activity of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Sarcoma 180-Bearing Mice. J. Nutr. 134: 945-950.
11. Semalty A. 2006. Mucoadhesive Polymers – A Review. Available from <http://www.pharmainfo.net/reviews/mucoadhesive-polymers-review>. Diakses 6 Mei 2014.
12. Gunawan F. 2014. Perbedaan Pengaruh Kitosan Berat Molekul Rendah dan Tinggi terhadap Jumlah Sel Limfosit pada Proses Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi. Skripsi. Universitas Hang Tuah, Surabaya. P. 18-17.
13. Sumardikan H. 2007. Penggunaan Carboxymethylcellulose (CMC) terhadap pH, Keasaman, Viskositas, Sineresis dan Mutu Organoleptik Yogurt Set. Skripsi. Universitas Brawijaya Malang. H. 1.
14. Siskawardani DD, Nur K, dan Moch. Bagus H. 2013. Pengaruh Konsentrasi Na-CMC (Sodium- Carboxymethyle Cellulose) dan Lama Sentrifugasi terhadap Sifat Fisik Kimia Minuman Asam Sari Tebu (Saccharum officinarum L). Jurnal Bioproses Komoditas Tropis, 1(1).
15. Sularsih. 2011. Penggunaan Kitosan dalam Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi Rattus norvegicus. Tesis. Universitas Airlangga Surabaya. H. 48-42.
16. Kung S, Devlin H, Fu E, Ho KY, Liang SY, Hsieh YD. 2011. The osteoconductive effect of kitosan-cholagen composites around pure

- titanium implant surface in rats. J Periodont Res 46:133-126.
16. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G dan Heras A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. Current Chemical Biology, 3: 230-203.
17. Alsarra IA. 2009. Chitosan Topical Gel Formulation in the management of Burn Wounds. International Journal of Biological Macromolecules. P 21-16.
18. Inan ZDS, dan Serpil US. 2013. Investigation of the wound healing effects of chitosan on FGFR3 and VEGF immunolocalization in experimentally diabetic rats. International Journal of Biomedical Materials Research, 1 (1): 8-1.
19. Kumar V, Cotran RS, Robbins, SL. 2004. Buku Ajar Patologi Edisi 7. Jakarta: EGC. P. 114-107.