

Reepitelisasi dan Ekspresi *Cytokeratin* (Ck) 16 pada Luka Superfisial dengan Pemberian Hialuronat Topikal dan Membran Amnion *Freeze-Dried*

Reepithelialization and Ck 16 Expression on Superficial-Thickness Wound with Topical Hyaluronate And Freeze-Dried Amniotic Membrane Treatment

Imam Susilo

Fakultas Kedokteran, Unair

Kampus A. Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 48 Surabaya 60131

Telp : 031-5020251, Fax. 031-5022472

Email : imam90.idaf@gmail.com

Abstract

Wound healing is a dynamic process involving mediators, blood cells, extracellular matrix and parenchymal cells. The function of cytokeratin (CK) 16 could be to promote reorganization of the cytoplasmic array of keratin filaments, an event that precedes the onset of keratinocyte migration into the wound site. Hyaluronic acid is one of the essential components of extracellular matrix, which plays a predominant role in tissue morphogenesis, cell migration, differentiation, and adhesion. Superficial-thickness excisional wounds were created along the backs of 32 adult wistar rats. They were divided into 2 groups. One was treated by freeze-dried amnion and 1% Low Molecular Weight Hyaluronate and the other was treated by freeze-dried amnion as control group. Each of the groups was divided into 2 sub groups. Each of the sub groups composed of 8 wistar rats based on the periode of termination : 3rd and 7th day after wounded. Histological evaluation was done to measure the thickness of epithelial tissue and expression of CK 16. Combination of freeze-dried amnion and low molecular weight hyaluronate on superficial-thickness excisional wounds improved reepithelialization characterized by cytokeratin 16 filament reorganization within cytoplasm.

Keywords : low molecular weight hyaluronate, epithelialization, CK 16

Pendahuluan

Di Amerika Serikat lebih dari 1,25 juta orang mengalami luka bakar dan 6,5 juta mengalami ulkus kulit kronik yang disebabkan oleh stasis vena atau diabetes melitus (Singer *et al.*, 1996). Dibutuhkan penanganan luka yang optimal agar tercapai penutupan luka secepatnya dan memberikan bekas luka yang estetik. Ada beberapa macam perawatan luka superfisial yang telah dikenal diantaranya menggunakan membran amnion (Saputro ID, Noer, 2001; Talmi *et al.*, 1990; Gajiwala and Gajiwala, 2003; Singh *et al.*, 2007). Pada tahun 1910 Davis pertama kali melaporkan penggunaan membran fetal untuk transplantasi kulit (Rafii *et al.*, 2008).

Sediaan membran amnion yang banyak dipakai pada penanganan luka adalah *freeze-dried amniotic membrane*. Membran amnion yang telah diawetkan secara *freeze-dried* praktis digunakan dan mudah didistribusikan tanpa memerlukan

medium & suhu penyimpanan tertentu, akan tetapi ternyata kadar *Growth Factor* yang ada didalamnya mengalami penurunan yang cukup signifikan (Wolbank *et al.*, 2009; Koizumi *et al.*, 2000; Thomasen *et al.*, 2009; Sri dkk., 2009; Ihsan, 2009; Pasaribu dkk., 2009). Hal ini yang menyebabkan membran amnion yang diawetkan hanya memiliki efektifitas sebagai *biological dressing* saja dengan sifat mekanik menghambat evaporasi luka dan sebagai barrier terhadap bakteri patogen dan setara dengan *synthetic polymer sheet* atau *transparent dressing* (Kumar, 2008; Padmani dan Perdanakusuma, 2008). Asam Hialuronat merupakan komponen glikosaminoglikan dalam matriks ekstraseluler yang berperan dalam proses penyembuhan luka dan dihasilkan oleh sel fibroblast (Shay *et al.*, 2009). Kandungan Hialuronat ini ditemukan dalam jumlah besar pada membran amnion segar. Hialuronat terdiri dari dua kelompok yakni *High Molecular Weight Hyaluronate* (Hialuronat HMW

) dan hasil degradasinya yang berupa *Low Molecular Weight Hyaluronate* (Hialuronat LMW) , dimana LMW terbukti memacu angiogenesis, mitosis dan migrasi sel keratinosit, fibroblas dan sel endothel (Gomes *et al.*, 2004; West DC, Fan, 2001; Chung *et al.*, 1999; Paladini *et al.*, 1996). Hialuronat LMW juga terbukti memacu produksi *Growth Factor* oleh makrofag dan memodulasi respon inflamasi pada proses penyembuhan luka. Beberapa penelitian menunjukkan hialuronat LMW mempercepat proses epitelialisasi (Wawer-sik *et al.*, 2001; Maytin *et al.*, 2004).

Fungsi protein CK 16 adalah merangsang terjadinya reorganisasi susunan filamen keratin di dalam sitoplasma, yang mendahului terjadinya mi-grasi keratinosit kearah tempat luka. Aplikasi membran amnion *freeze-dried* dan hialuronat LMW pada luka superfisial kulit diharapkan mampu saling menunjang dalam proses penyem-buhan luka dan mempercepat proses epitelialisasi.

Materi dan Metode Penelitian

Obyek penelitian adalah tikus putih jantan usia 40-60 hari dengan berat badan 200-300 gram, dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan secara *simple random sampling*. Pada kedua kelompok dibuat luka superfisial dengan cara eksisi tangensial. Eksisi dilakukan sampai tampak adanya bintik-bintik perdarahan atau tampak lapisan dermis yang mengkilat. Pada kelompok kontrol luka ditutup dengan membran *amnion preserved*, sedang perlakuan luka diolesi dengan larutan *low molecular weight hyaluronate* 1% kemudian ditutup dengan amnion. Semua luka ditutup dengan kasa tebal dengan jahitan meng-gunakan *silk* 4.0 pada punggung tikus. Kedua kelompok dilakukan pengamatan secara histo-patologis pada hari ke-3 dan ke-7 setelah di-lakukan pengorbanan tikus dengan cara dekapitasi, untuk mengetahui proliferasi sel keratinosit dengan mengukur ketebalan jaringan epidermal

Parameter yang diuji adalah tebal epitel dan ekspresi CK 16 antara kedua kelompok pada hari ke-3 dan ke-7. Pemeriksaan ekspresi protein *cytokeratin* 16 dilakukan dengan menghitung jumlah sel epitel kulit tikus yang mengekspresikan CK 16 berdasarkan warna coklat pada sitoplasma sel epitel pada seluruh jaringan luka dalam satu *slide* dengan pemeriksaan imunohistokimia meng-gunakan mikroskop cahaya pembesaran obyektif 40 x. Pemeriksaan tebal epitel dilakukan dengan mengukur rata-rata ketebalan seluruh lapisan mulai dari sel epitel lamina basalis sampai lapisan epitel pipih permukaan paling atas menggunakan peng-ukur mikrometer dengan pembesaran obyektif 40 x pada 3 tempat berbeda secara acak setiap sediaan yakni bagian tepi kanan, kiri dan tengah.

Selanjutnya dilakukan uji statistik dengan *Independent t-test* apabila data dalam distribusi normal, dengan tingkat kesalahan 5% untuk mengetahui perbedaan tebal dan ekspresi protein *cytokeratin* 16 antara kedua kelompok. Hasil perhitungan dikatakan bermakna bila diperoleh harga $p \leq 0,05$. Namun apabila data tidak dalam distribusi normal, maka dilakukan uji Wilcoxon-Mann-Whitney test. Untuk menguji normalitas data digunakan uji Kolmogorov Smirnov. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabulasi, dan teks sebagai penjelasan.

Hasil dan Pembahasan

Ekspresi Protein Cytokeratin 16

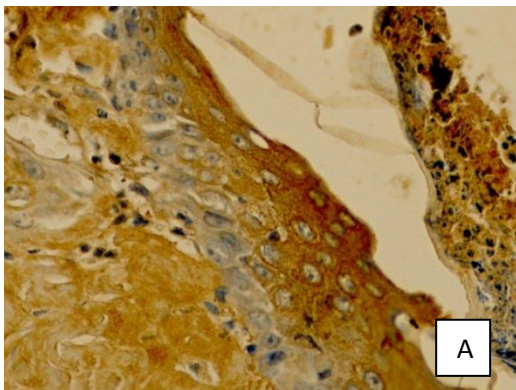
Pemeriksaan ekspresi protein *cytokeratin* 16 dilakukan dengan cara penghitungan jumlah sel epitel kulit tikus yang tercatat positif (warna coklat pada sitoplasma sel) pada seluruh jaringan luka dalam satu *slide* dengan pemeriksaan immuno-histokimia menggunakan mikroskop cahaya pem-besaran obyektif 40 x. Hasil pemeriksaan ekspresi protein *cytokeratin* 16 sel epitel ditampilkan pada tabel 1 dan 2 dibawah ini :

Tabel 1. Ekspresi protein *cytokeratin* 16 pada hari ke-3

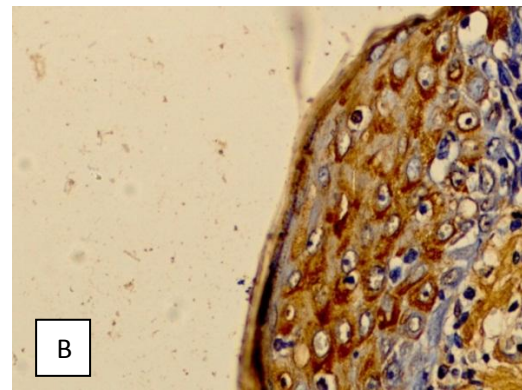
Kelompok	N	Ekspresi protein <i>cytokeratin</i> 16			
		Rata-Rata (<i>Mean</i>)	Standar deviasi (SD)	Minimum	Maksimum
Kontrol	8	151,13	15,887	-0,197	0,171
Perlakuan	8	241,13	33,694	-0,135	0,205

Tabel 2. Ekspresi protein *cytokeratin 16* pada hari ke-7

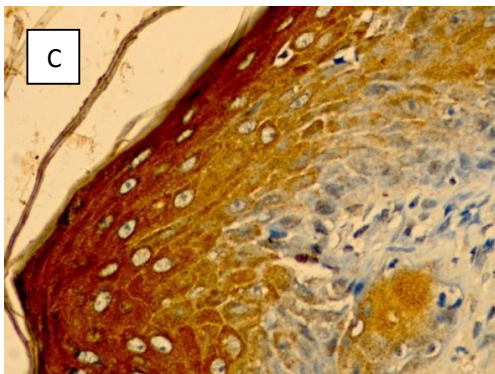
Kelompok	N	Ekspresi protein <i>Cytokeratin 16</i>			
		Rata-Rata (Mean)	Standar deviasi (SD)	Minimum	Maksimum
Kontrol	8	490,50	22,716	-0,145	0,137
Perlakuan	8	757,88	33,008	-0,194	0,148



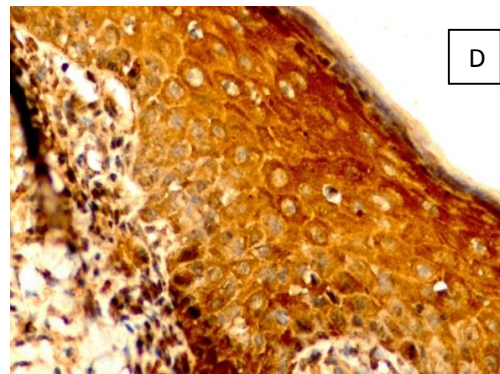
Gambar A. Ekspresi protein CK 16 positif pada sitoplasma beberapa sel keratinosit kelompok kontrol hari ke 3 (Imunohistokimia, mikroskop cahaya obyektif 40x)



Gambar B. Ekspresi protein CK 16 positif lebih banyak pada sitoplasma sel keratinosit kelompok perlakuan hari ke 3 (Imunohistokimia, mikroskop cahaya obyektif 40x)



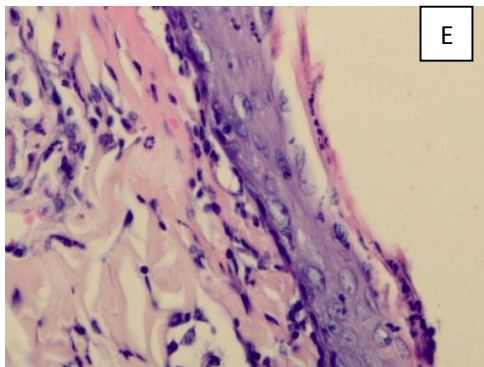
Gambar C. Ekspresi protein CK 16 positif pada sitoplasma sebagian sel keratinosit kelompok kontrol hari ke-7 (Imunohistokimia, mikroskop cahaya obyektif 40x)



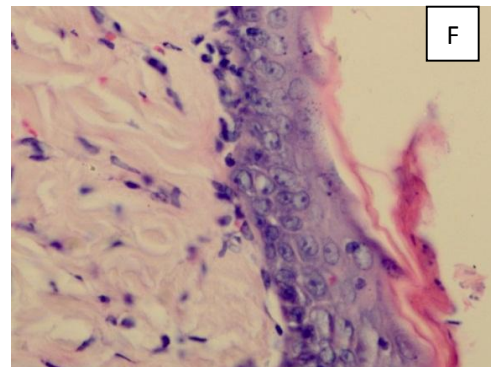
Gambar D. Ekspresi protein CK 16 positif pada hampir seluruh sitoplasma sel keratinosit kelompok perlakuan hari ke-7 (Imunohistokimia, mikroskop cahaya obyektif 40x)

Terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi protein *cytokeratin 16* kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke 3 dan ke 7, yang dibuktikan dengan uji *independent samples t- test* variansi heterogen pada hari ke-3 dan uji *independent samples t- test* variansi homogen pada hari ke-7 didapatkan nilai $p = 0,000$.

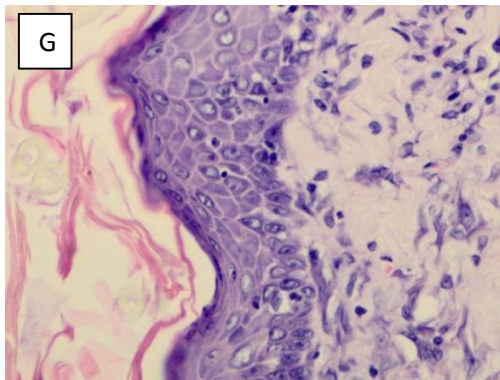
Ekspresi protein *cytokeratin 16* pada sel keratinosit yang baru terbentuk baik hari ke 3 maupun ke 7 lebih banyak pada kelompok perlakuan dari pada kelompok kontrol, dengan $p = 0,000$. Pada penelitian menunjukkan bahwa induksi dan akumulasi protein *cytokeratin 16* berperan pada proses aktivasi keratinosit epitelialisasi,



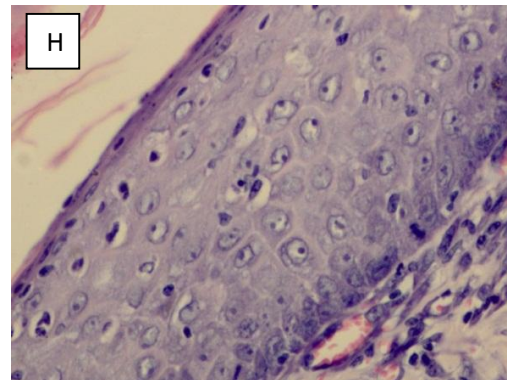
Gambar E. Menunjukkan tebal lapisan sel epitel kelompok kontrol pada hari ke-3 (Hematoxylin Eosin, mikroskop cahaya obyektif 40x)



Gambar F. Menunjukkan tebal lapisan sel epitel kelompok perlakuan (lebih tebal) pada hari ke-3 (Hematoxylin Eosin, mikroskop cahaya obyektif 40x)



Gambar G. Menunjukkan tebal lapisan sel epitel kelompok kontrol pada hari ke-7 (Hematoxylin Eosin, mikroskop cahaya obyektif 40x)



Gambar H. Menunjukkan jumlah dan tebal lapisan sel epitel kelompok perlakuan (lebih tebal) pada hari ke-7 (Hematoxylin Eosin, mikroskop cahaya obyektif 40x)

dengan cara menstimulasi terjadinya reorganisasi filamen *cytokeratin 16* dalam sitoplasma keratinosit, yang ditandai dengan peningkatan mitosis, hipertrofi sel serta peningkatan ekspresi protein CK 16 di dalam sitoplasma (Paladini *et al.*, 1996), hal ini juga terbukti pada penelitian ini.

Penelitian ini menunjukkan bahwa tebal epitel optimal terjadi pada hari ke 7, dan tidak demikian pada hari ke 3, dengan didapatkan perbedaan tidak bermakna secara statistik antara tebal epitel kelompok kontrol dan perlakuan ($p = 0,173$). Pada hari ke 7 didapatkan perbedaan bermakna antara tebal epitel kelompok kontrol dan perlakuan ($p = 0,000$). Informasi tersebut sesuai dengan penelitian *in vivo* terdahulu yang menunjukkan bahwa proses reepitelisasi luka pada kulit merupakan peningkatan aktivitas mitosis dan migrasi keratinosit tepi luka dan membutuhkan waktu lebih dari 8 hari pada penyembuhan luka (Ihsan, 2009; Paladini *et al.*, 1996; Wawersik *et al.*,

2001). Dengan demikian menunjukkan bahwa peranan hialuronat yang ditambahkan pada kelompok perlakuan, memacu migrasi, proliferasi serta diferensiasi keratinosit dalam proses penyembuhan luka (Wawersik *et al.*, 2001).

Pada akhirnya terbukti bahwa hialuronat mampu meningkatkan migrasi dan proliferasi sel keratinosit pada proses penyembuhan luka superfisial yang ditandai dengan peningkatan tebal jaringan epidermal dengan induksi dan ekspresi CK 16.

Kesimpulan

Pemakaian kombinasi amnion *freeze-dried* dan hialuronat LMW pada luka superfisial terbukti dapat meningkatkan kecepatan penyembuhan dan epitelialisasi yang ditandai dengan tebal jaringan epidermal dan reorganisasi filamen *cytokeratin 16* di dalam sitoplasma.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS., sebagai konsultan statistik dan Hj. Meianti, dr., dalam pengumpulan serta pengolahan data pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Singer A.J. and AB.. Dagum. 2008. Current Management of Acute Cutaneous Wound. *The New England Journal of Medicine*. 359:1037-46.
- Singer A.J., R.A.F. Clark and F.H. Epstein. 1999. Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*. 738-46.
- Saputro I.D. and M.S. Noer. 2001. Aplikasi Amnion pada Perawatan Luka Bakar derajat II Superficial di Lab/SMF.Bedah Plastik RSUD Dr.Soetomo Surabaya, Karya Akhir Penelitian. Surabaya: Lab / SMF.Bedah Plastik RSUD Dr.Soetomo.
- Talmi Y.P., Y. Finkelstein and Y. Zohar. 1990. Use of Human Amniotic Membrane as a Biological Dressing. *Eur J Plast Surg*. 13:160-2.
- Gruss J.S. and W.D. 1978. Jirsch. Human Amniotic Membrane : a Versatile Wound Dressing. *J. Canadian Med Ass* . 118:1237-46
- Gajiwala K. and A.L. Gajiwala. 2003. Use of Banked Tissue in Plastic Surgery. *Cell Tissue Banking*. 4:141-6
- Singh R., S. Purohit and M.P. Chacharkar. 2007. Microbiological Safety and Clinical Efficacy of Radiation Sterilized Amniotic Membrane for Treatment of Second Degree Burns. *Burns*. 33:505-10
- Rafii A.B., H.R. Aghayan, B. Arjmand and M.A. Javadi. 2007. Amniotic Membrane Transplantation Iran *J Ophthalmic Res*. 2 (1): 58-75.
- Wolbank S., F .Hildner, H. Redl, M.V. Griensven and C. Gabriel C. 2009. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factor. *J Tissue Engineering and Regenerative medicine*. 3: 651-4.
- Koizumi N., T. Inatomi, C. Sotozono, N.J. Fullwood, A.J. Quantock and S. Kinoshita. 2000. Growth Factors mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *J Current Eye Research*. 20(3): 173-7.
- Thomasen H., M. Pauklin, K.P. Steuhl and D. Meller. 2009. Comparison of Cryopreserved and Freeze-Dried Amniotic Membrane for ophthalmologic applications, *J Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 50: 1792
- Sri S.E., D.Yogiantoro and G. Suhendro. 2009. The Difference of TGF β 2 Concentration between Fresh Amniotic Membrane and Freeze-Dried Amniotic Membrane. Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial / Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo.
- Ihsan M. 2009. Perbedaan Kadar EGF pada Membran Amnion Segar dan Membran Amnion Kering Beku (Freeze-Dried). Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial / Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo.
- Pasaribu I.A., R.G. Hoesin and G. Suhendro. 2009. Pengaruh Kriopreservasi -80°C terhadap Kadar basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) pada Membran Amnion. Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial / Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo.
- Kumar P. 2008. Classification of Skin Substitute. *Burns*. 34:148-9.
- Padmani R.D. and D.S. Perdanakusuma. 2008. Perbandingan Efektifitas Pemakaian Hemicellulose Dressing dengan Calcium Sodium Alginate, Amnion dan Tulle pada Luka Donor Split Thickness Skin Graft. Surabaya: Lab/SMF Ilmu Bedah Plastik RSUD Dr.Soetomo
- Jenkins R.H., J.D. Williams and R. Steadman. 2005. Fibroblasts Transformed to a Wound Healing Phenotype Accumulate a Hyaluronan-Rich Extracellular Matrix Through Reduced Degradation. *European Cells and Materials*. 10: 69.
- Shay E., H. He and S. Zhang. 2009. Hyaluronan Complex purified from Human Amniotic Membrane Extract inhibits proliferation of Endothelial Cells and Macrophage. *J Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50:5560
- Gomes J.A.P., R. Amankwah, A.P. Richards and H.S. Dua. 2004 Sodium Hyaluronate (Hyaluronic Acid) promotes migration of Human Corneal Epithelial Cells in vitro. *British Journal of Ophthalmology*. 8:821-5.
- West D.C. and T.P.D. Fan. 2001. Hyaluronan Oligosaccharides Promotes Wound Repair. It's size-dependent regulation of angiogenesis In: *The New Angiotherapy* 1st ed. England: Humana Press.
- Chung J.H., Y.K. Park and S.M. Paek. 1999. Effect of Na-Hyaluronan on Stromal and Endothelial Healing in Experimental

- Corneal Alkali Wound. J Ophthalmic Res 31: 432-9.
- Paladini R.D., K. Takahashi and P.A. Coulombe. 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. J Cell Biol. 132(3):381-97.
- Wawersik M.J., S. Mazzalupo, D. Nguyen and P.A. Coulombe. 2001. Increased Levels of Keratin 16 Alter Epithelialization Potential of Mouse Skin Keratinocytes In Vivo and Ex Vivo. Molecular Biology of the Cell.(12): 3439-50.
- Maytin E.V, H.H Chung and V.M Seetharaman. 2004. Hyaluronan Participates in the Epidermal Response to Disruption of the Permeability Barrier in Vivo. AJP. 165 : 1331-41.