

Penggunaan kitosan dengan berat molekul berbeda terhadap jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka pencabutan gigi

(The difference effect Using chitosan with different molecular weight to angiogenesis on wound healing process of dental extraction)

Sularsih

Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah
Surabaya - Indonesia

Korespondensi (correspondence): Sularsih, Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah. Jl. Arif Rachman Hakim 150 Surabaya 60111, Indonesia. E-mail: larsihdentist@gmail.com

ABSTRACT

Background: Angiogenesis is new blood vessels. It required for wound healing process, nutrient and oxygen supply to proliferate, migrate and survive. Chitosan gel support adhesion and differentiation of endothelial cells. **Purpose:** The aim of this study was to compare the angiogenesis on wound healing process of dental extraction using different molecular weight of chitosan gel. **Method:** *Rattus norvegicus* strain wistar male, aged 8-16 weeks, divided into 3 treatment groups namely group I which given chitosan gel with high molecular weight. Group II which given chitosan with low molecular weight and group III which was not given chitosan gel. Chitosan gel were applied into the socket of dental extraction. Rat was decapitated 7 days after chitosan application and the jaw in the treated regions and control group were cut for histopathological to observe the angiogenesis process. Data were analyzed using One way Anova test. **Result:** The result showed significant differences of Angiogenesis between groups with different molecular weight. The angiogenesis of using chitosan with high molecular weight more greater than using chitosan with low molecular weight ($p<0,05$). **Conclusion:** Chitosan gel with high molecular weight enhanced the angiogenesis on wound healing process of dental extraction.

Keywords: chitosan; angiogenesis; wound healing

PENDAHULUAN

Kopolimer dari N-asetil-glukosamin dan N-glukosamin adalah kitosan. Kitosan sebagai polimer alam kationik, telah banyak digunakan sebagai *topical dressing* pada luka karena memiliki sifat antimikroba, tidak toksik, biokompatibel, *biodegradable*, hemostatik dan memodulasi fungsi sel-sel inflamasi.¹ Kitosan dapat mempercepat granulasi dan proses penyembuhan berikutnya sehingga terjadi percepatan penyembuhan luka.²

Efektivitas bahan kitosan dalam penggunaanya dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu berat

molekul, derajat deasetilasi, viskositas, kelarutan, dan pH.^{1,3,4} Beberapa peneliti telah menemukan bahwa percepatan proses penyembuhan luka oleh kitosan terkait dengan struktur kimianya. Kitosan dengan berat molekul tinggi dan derajat deasetilasi tinggi telah ditemukan lebih efektif daripada kitosan berat molekul sedang atau rendah dalam penyembuhan luka bakar.⁵ Kitosan yang memiliki berat molekul rendah, ukuran partikelnya juga makin kecil, sehingga viskositasnya akan semakin rendah.⁶ Kitosan berat molekul tinggi memiliki viskositas tinggi, sedangkan kitosan berat molekul rendah memiliki viskositas lebih rendah dan

panjang rantai molekul yang pendek.⁷ Penggunaan kitosan secara topikal dapat segera menimbulkan efek pada proses penyembuhan luka secara cepat karena absorpsi yang sangat cepat oleh jaringan saat diaplikasikan.⁵

Pada tindakan ekstraksi gigi akan menimbulkan luka pada prosesus alveolaris berupa soket yang terbuka. Luka yang terjadi pada sel-sel tubuh akan direspon oleh tubuh dengan mekanisme penyembuhan luka, begitu juga pada luka pasca ekstraksi gigi.⁸ Proses penyembuhan luka terbagi menjadi 4 fase yaitu koagulasi atau hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodelling. Tahap proliferasi dimulai pada hari ke-3 setelah terjadi luka. Pada proses penyembuhan luka terjadi migrasi sel fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler, sintesis kolagen, angiogenesis dan pembentukan jaringan granulasi.⁹

Angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru sangat penting dalam proses penyembuhan luka karena pembuluh darah menyuplai oksigen dan nutrisi yang penting untuk menyokong metabolisme sel.^{10,11} Jumlah pembuluh darah pada proses penyembuhan luka khususnya pada tahap proliferasi akan bertambah banyak dibandingkan pada keadaan normal. Tonnesen¹¹ serta Asparini¹² menyatakan bahwa angiogenesis dimulai pada hari ke-3 setelah terjadinya luka. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang penting untuk proses angiogenesis saat pembentukan jaringan granulasi pada hari ke-4 sampai dengan hari ke-7 akan meningkat dan mulai berkurang pada hari ke-10. Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan untuk membuktikan penggunaan bahan kitosan dengan viskositas dan berat molekul yang berbeda yang dapat menunjang penyembuhan luka pencabutan gigi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan dengan viskositas tinggi dapat meningkatkan jumlah sel fibroblas dan sel osteoblas, kolagen tipe 1 pada luka pencabutan gigi dengan lama pengamatan 7 dan 14 hari.¹³ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah pembuluh darah dalam proses penyembuhan luka dengan menggunakan kitosan yang memiliki berat molekul yang berbeda. Proses angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah sangat penting dalam penyembuhan luka.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini termasuk jenis penelitian laboratorium (*experimental research*) atau penelitian experimental, dengan menggunakan rancangan

penelitian *true experimental design – post test only control group design*. Hewan coba yang dipergunakan pada penelitian ini ialah tikus wistar putih (*Rattus novergicus strain wistar*). Besar sampel penelitian ini adalah 30 ekor tikus wistar yang terbagi dalam 3 kelompok, masing-masing kelompok 10 ekor tikus wistar.

Serbuk kitosan yang digunakan dengan merk SIGMA-ALDRICH yang memiliki berat molekul tinggi (Product number= 419419, Lot number= MKBH5816V) dan kitosan dengan berat molekul rendah (Product number= 448869, Lot number= MKBH7256V). Serbuk kitosan yang digunakan memiliki besar derajat deasetilasi lebih dari 85 %. Kitosan gel 1% (w/p) dibuat dengan melarutkan 1 gram bubuk kitosan dalam 100 ml asam asetat 2% sesuai dengan aturan pabrik sehingga menjadi sediaan bentuk gel yang kemudian dinetralkan dengan larutan NaOH sehingga menjadi sediaan kitosan gel 1 % yang memiliki pH netral.

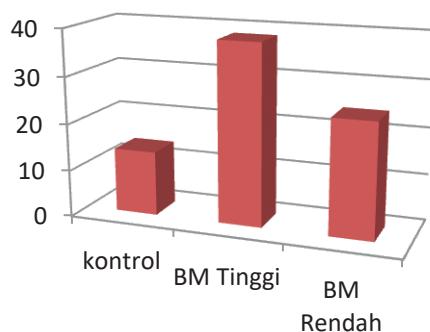
Kitosan gel dengan konsentrasi 1% (w/v) dimasukkan di soket tempat luka bekas pencabutan gigi *incisive* rahang bawah menggunakan *syringe* dengan ujung berdiameter kecil, kemudian dijahit dengan *non resorbable sutures*. Tikus perlakuan dan tikus kontrol didekaputasi pada hari ke 7 setelah perlakuan. Tulang rahang di daerah interdental gigi *Incisive* rahang bawah dipotong dan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi *buffer formalin* 10 %. Setelah itu dilakukan proses dehidrasi dengan larutan alkohol, *clearing* dengan larutan *xylen*, infiltrasi dengan cairan parafin dan *embedding* dalam blok parafin. Tahapan terakhir adalah pemotongan yang dilakukan dengan *rotary microtome* secara serial dengan ketebalan 4 μm . Sayatan jaringan ditempelkan pada gelas objek yang siap untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi anatomi dengan pengecatan hematoksilin eosin (HE). Pengamatan proses angiogenesis dilakukan pada sepertiga bagian apikal gigi yang berbatasan dengan tulang alveolaris.

HASIL

Rerata dan simpang baku jumlah pembuluh darah pada setiap kelompok perlakuan kitosan dengan berat molekul, viskositas tinggi; kelompok kitosan dengan berat molekul, viskositas rendah dan kelompok kontrol pada lama pengamatan 7 hari dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1. Gambaran hasil histopatologi anatomi jumlah pembuluh darah masing-masing kelompok ditunjukkan pada gambar 2.

Tabel 1. Rerata dan simpang baku jumlah pembuluh darah pada setiap kelompok kitosan dengan berat molekul dan viskositas tinggi; kelompok kitosan dengan berat molekul rendah dan viskositas rendah lama pengamatan 7 hari dan kelompok kontrol

Variabel	Perlakuan	Rerata \pm SD
Jumlah pembuluh darah	Berat molekul dan viskositas tinggi	38,38 \pm 2,45
	Berat molekul dan viskositas rendah	24,5 \pm 2,11
	Kontrol	13,75 \pm 1,98



Gambar 1. Jumlah pembuluh darah pada masing – masing kelompok perlakuan pada lama pengamatan 7 hari.

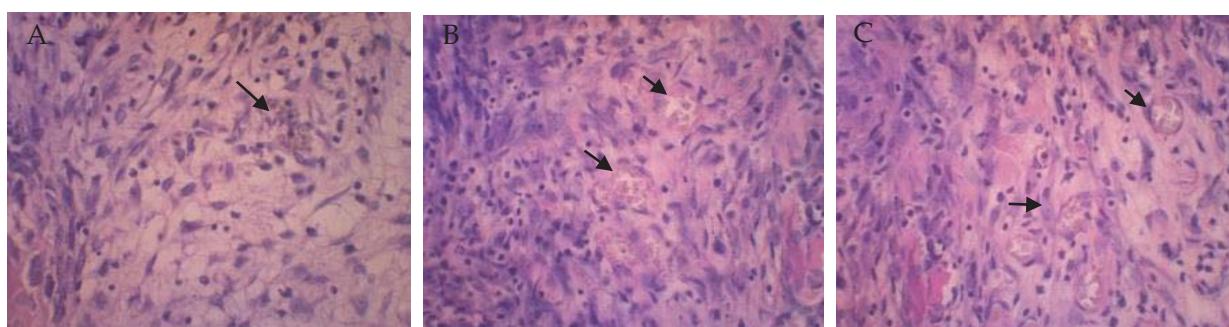
Rerata dan simpang baku jumlah pembuluh darah yang didapat dianalisa dengan uji statistik *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa semua data berdistribusi normal ($p>0,05$), sehingga memenuhi persyaratan menggunakan uji parametrik. Hasil uji *one way Anova* perbandingan antara kelompok perlakuan kitosan dengan berat molekul dan viskositas tinggi, kelompok perlakuan kitosan dengan berat molekul dan viskositas rendah serta kelompok kontrol pada lama pengamatan 7 hari setelah perlakuan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p<0,05$). Rerata jumlah

pembuluh darah pada kelompok perlakuan dengan berat molekul dan viskositas tinggi pada pengamatan 7 hari lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol serta kelompok perlakuan dengan berat molekul rendah dan viskositas rendah.

PEMBAHASAN

Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari chitin. Kitosan memiliki kandungan glicoaminoglycan (GAG). Kandungan GAG berperan penting dalam modulasi angiogenesis. Hal ini sangat penting dalam ikatan antara faktor angiogenik dengan reseptor-reseptornya.³

Pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi yang baru. Angiogenesis merupakan proses yang kompleks berkaitan dengan matriks ekstraseluler pada luka seperti halnya migrasi dan stimulasi mitogenik sel endothel. Induksi angiogenesis juga distimulasi oleh fibroblast growth factor (FGF). Faktor-faktor angiogenik terutama *basic fibroblast growth factor* (b-FGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) memfasilitasi terjadinya angiogenesis dengan menstimuli proliferasi dan migrasi sel endotel untuk membentuk pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang ada. *Basic fibroblast growth factor* selain berperan dalam pembentukan pembuluh darah baru juga berperan dalam migrasi sel fibroblas, sel makrofag, sel endotel dan sel epitel pada jaringan yang rusak. Beberapa penelitian mengatakan VEGF tidak hanya berperan dalam inisiasi angiogenesis namun juga berperan dalam stabilisasi vaskular. VEGF terikat pada reseptor tirosin kinase yaitu



Gambar 2. Sediaan Histopatologi Anatomi jumlah pembuluh darah pada (A) kelompok kontrol; (B) kelompok kitosan dengan berat molekul, dan viskositas rendah; (C) kelompok kitosan dengan berat molekul rendah dan viskositas tinggi lama pengamatan 7 hari

VEGFR-1 dan VEGFR-2. Ikatan dengan VEGFR-2 terutama menginduksi pembentukan dan proliferasi sel endotel, sedangkan ikatan dengan VEGFR-1 berhubungan dengan peningkatan permeabilitas vaskular, induksi *matrix metalloproteinase* (MMPs), serta pembentukan tubulus pada kapiler. Ikatan yang kuat antara VEGF dan b-FGF dengan reseptornya akan mengakibatkan terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel endotel sehingga mempercepat terbentuknya pembuluh darah baru.¹²

Pada penelitian ini kelompok perlakuan dengan kitosan gel yang memiliki berat molekul tinggi menghasilkan jumlah pembuluh baru yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan kitosan gel yang memiliki berat molekul rendah. Berat molekul bergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi. Kitosan dengan berat molekul yang tinggi memiliki ukuran partikel serbuk kitosan yang besar sehingga menyebabkan lebih lama larut dalam asam asetat. Semakin besar berat molekul dan semakin besar viskositas gelnya maka konsistensi gel semakin kental.¹⁴ Kitosan gel dengan konsistensi yang lebih kental memiliki sifat mucoadhesive yang lebih besar sehingga lebih menunjang penyembuhan luka.¹ Sifat biologis kitosan termasuk biodegradasi kitosan oleh enzim lizosim yang akan memecah *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *polimer* menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *dimer* aktif dan membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang merupakan makromolekul matriks ekstraseluler serta menstimulasi peningkatan TGF- β 1 dan FGF 2.¹⁵ Sel inflamasi yang bermigrasi ke arah luka didominasi oleh sel mononuklear seperti sel makrofag. Pemberian kitosan akan memicu sel makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin yang berupa TGF- β 1.¹⁶ *Transforming growth factor betha 1* (TGF- β 1) dan FGF 2 merupakan *growth factors* yang memicu proliferasi sel fibroblas pada penyembuhan luka.¹⁵ Sel Fibroblas menghasilkan matriks ekstraseluler baru yang perlu untuk mendukung proses penyembuhan dan pembuluh darah untuk mengangkut oksigen dan nutrisi yang diperlukan untuk mendukung metabolisme sel. *Growth factor*, khususnya PDGF, FGF dan TGF β 1, bersama-sama dengan molekul matriks ekstraseluler memacu sel fibroblas dari jaringan sekitar luka untuk berproliferasi dan mengekspresikan reseptor integrin.^{17, 18}

Kitosan dapat meningkatkan fungsi sel inflamasi seperti *polymorphonuclear leukocytes* (PMN), makrofag

(fagositosis, produksi *interleukin* (IL-1), *transforming growth factor* β 1 dan *platelet-derived growth factor*.¹⁶ Peran kitosan dalam mengoptimalkan fase inflamasi akan berdampak pula pada pembentukan pembuluh darah. Peningkatan jumlah sel-sel inflamasi pada daerah luka akan memicu faktor-faktor yang menginduksi angiogenesis. Akibatnya, pembentukan pembuluh darah baru dapat semakin cepat terjadi. Hal ini terbukti dari hasil penelitian pada kelompok perlakuan dengan kitosan memiliki perbedaan jumlah pembuluh darah yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan dengan kitosan gel terdapat peningkatan jumlah pembuluh darah yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan adanya peningkatan jumlah pembuluh darah tersebut diharapkan penggunaan kitosan gel dapat mempercepat proses penyembuhan luka pencabutan gigi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther 2011; 9(7): 857-793.
2. Budihargono O, Yuliati A, Rianti D. Peningkatan mobilisasi sel polimorfonuklear setelah pemberian gel kitosan 1% pada luka pencabutan gigi Cavia cobaya. Material Dental Journal 2013; 4(1):11-16
3. Kim F. Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis. Louisiana State University; 2004. h. 6-7.
4. Sularsih. Penggunaan kitosan dalam proses penyembuhan luka pencabutan gigi *Rattus norvegicus*. Tesis. Surabaya: Universitas Airlangga; 2011. h. 42-8.
5. Alsarra IA. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. International Journal of Biological Macromolecules 2009; Vol 45: 16-21.
6. Chattopadhyay DP, Inamdar MS. Studies on synthesis, characterization and viscosity behaviour of nano chitosan. Res J Engineering Sci October 2012; 1(4): 9-15.
7. Maeda Y, Kimura Y. 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 2004; 134: 945-50.
8. Pedlar J. Oral and maxillofacial surgery: an objective-based textbook. Churchill Livingstone; 2001.
9. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanism. The Journal of International Medical Research 2009; 37: 1528 -42.
10. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Buku saku dasar patologis penyakit. Robbins & Cotran, editor. 7th ed. Jakarta: EGC; 2006. h. 57.

11. Tonnesen MG, Feng X, Clark RAF. Angiogenesis in wound healing. New York: Department of Dermatology, Health Sciences Center T16, 060, SUNY at Stony Brook, Stony Brook, NY 11794-8165; 2000. p. 40-6.
12. Asparini RR. Peran heparin dalam angiogenesis, epitelialisasi dan penyembuhan luka bakar. Jurnal Saintika Medika 2011, 7(14): 26-31.
13. Sularsih. Type 1 Collagen on wound healing process of dental extraction with different weight molecular of chitosan. Proseding Dentisphere, FKG UHT, 2013;
14. Rochima E. Karakterisasi kitin dan kitosan alas limbah ranjungan Cirebon Jawa Barat. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia; 2007; 10(1).
15. Chin L, Halim AS. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan [derivatives in wound management. J Molecular Science 2009; 10(3): 1300-13.
16. Ueno H, Nakamura F, Mukarami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and growth factors production by macrophages. J Biomaterials 2001; 22: 2125-30.
17. Topazian RG, Goldberg MH, Hupp JR. Oral and maxillofacial infections. 4th ed. United States of America: Elsevier Saunders; 2002. p. 2-157.
18. Nanci A. Ten Cate's oral histology, development, structure, and function. Seventh Edition. St Louis: Mosby Elsevier; 2008. p. 380-3, 388-9.