

## INTISARI

Neutrofil pada fase inflamasi penyembuhan luka menghasilkan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) pada proses fagositosis. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) adalah radikal bebas yang diperlukan pada penyembuhan luka, namun ketika jumlahnya berlebih akan terjadi stres oksidatif yang memperpanjang fase inflamasi. Superoxide dismutase (SOD) merupakan enzim antioksidan endogen yang bekerja menangkap ROS, sehingga dapat digunakan sebagai marker dari stres oksidatif. Terapi yang dikembangkan sebagai antioksidan untuk mengendalikan ROS salah satunya *Hydrogen Rich Water* yang memiliki efek antiinflamasi sehingga mempercepat penyembuhan luka. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian hydrogen rich water secara oral terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan jumlah neutrofil pasca eksisi kulit.

Dua puluh empat tikus Wistar yang dibuat luka eksisi dengan *punch biopsy* pada kulit punggung kanan dan kiri dibagi menjadi 2 kelompok: kelompok perlakuan yang diberi minum *hydrogen rich water* dan kelompok kontrol diberi air mineral. Luka sebelah kanan dilakukan pemeriksaan kadar SOD dengan *SOD Activity Colorimetric Assay Kit* (Biovision<sup>+</sup>) dan luka kiri dilakukan pemeriksaan jumlah neutrofil dengan pewarnaan *Hematoxilin Eosin*. Pengamatan pada hari ke-2 dan hari ke-5 pasca eksisi.

Hasil statistik uji Two Way ANOVA dan Post Hoc LSD menunjukan SOD pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol ( $P:0,00$ ), dan jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol ( $P=0,00$ ). Uji korelasi Pearson menunjukkan terdapat korelasi antara kadar SOD dan jumlah neutrofil ( $r=-0,73$ ;  $p=0,00$ ). Kesimpulan: pemberian *hydrogen rich water* secara oral mampu secara signifikan menaikkan kadar SOD dan menurunkan jumlah neutrofil.

**Kata kunci :** *reactive oxygen species, hydrogen rich water, superoxide dismutase, neutrofil*

## ABSTRACT

*Neutrophils in the wound healing inflammatory phase produce Reactive Oxygen Species (ROS) in the phagocytic process. Reactive Oxygen Species (ROS) are free radicals that is usefull in wound healing, but when they stacked in excessive amount it will lead to oxidative stress which prolongs the inflammatory phase. Superoxide dismutase (SOD) is an endogenous antioxidant enzyme that works to capture ROS, so it can be used as a marker of oxidative stress. Hydrogen Rich Water is a therapy that was developed as an antioxidant to control ROS, it has an anti-inflammatory effect that accelerates wound healing. The purpose of this study was to determine the effect from oral administration of hydrogen rich water on superoxide dismutase levels and the amount of neutrophils after skin excision.*

*Twenty-four Wistar excised with punch biopsy on the back skin on the right and left were divided into 2 groups: the treatment group that was oral administered with hydrogen rich water and the control group was given mineral water. The right wound was examined for SOD levels with SOD Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision +) and the left wound was examined for neutrophil counts by Hematoxilin Eosin staining with observation on day 2 and day 5 after excision.*

*Statistical results of the Two Way ANOVA and Post Hoc LSD test showed that the SOD level in the treatment group was higher than in the control group ( $P: 0.00$ ), and the number of neutrophils in the treatment group was lower than in the control group ( $P= 0.00$ ). Pearson correlation test shows there is a correlation between SOD levels and neutrophil counts ( $r= -0.73$ ;  $p= 0.00$ ). Conclusion: Oral administration of hydrogen rich water can significantly increase SOD levels and reduce the number of neutrophils.*

**Keywords:** *reactive oxygen species, hydrogen rich water, superoxide dismutase, neutrophil*

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang Masalah

Proses penyembuhan luka melibatkan radikal bebas dalam bentuk *reactive oxygen species* (ROS) dalam setiap tahapnya. Proses migrasi, adesi, proliferasi, neovaskularisasi, *remodelling*, dan apoptosis merupakan rangkaian yang melibatkan ROS. Sebagian besar ROS dihasilkan oleh sel-sel neutrofil dan makrofag, dan sampai batas tertentu juga diproduksi oleh fibroblas dan sel endotel (Wlaschek dan Kochanek, 2005). Produksi ROS pada awal terjadinya luka dimulai dari platelet yang memproduksi ROS untuk merekrut platelet tambahan pada lokasi luka. Sistem imun kemudian bereaksi melakukan rekrutmen leukosit. Leukosit kemudian mengaktifasi makrofag sebagai fagosit. Fungsi fagositosis ini akan memproduksi agen sitotoksik yang mencegah penyebaran infeksi serta menyingkirkan sel yang rusak. Proses fagositosis juga akan memproduksi ROS sebagai hasil samping (Rao dkk., 2011).

*Reactive Oxygen Species* pada keadaan normal dipercaya memainkan peran penting dalam sinyal intraseluler, ekspresi gen, dan berbagai fungsi fisiologis, namun bila produksi ROS tidak terkontrol hingga berada dalam konsentrasi yang tinggi akan menjadi stres oksidatif (Robbins & Zhao 2004). Stres oksidatif akan membuat jaringan terus memproduksi radikal bebas dan ini akan menjadi reaksi produksi ROS berkelanjutan. Dampak stres oksidatif akan merusak sel dan jaringan, radikal bebas tidak terkontrol akan mengambil elektron

dari sel sehat dan akibatnya terjadi apoptosis dan nekrosis dari sel (Park, W. Y., 2013).

Tubuh memiliki antioksidan endogen yang berfungsi sebagai pertahanan awal mencegah terjadinya penumpukan radikal bebas. Salah satu antioksidan ini adalah enzim *superoxide dismutase* (SOD) yang berfungsi sebagai pencegahan terhadap stres oksidatif dengan cara mengubah radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Aktivitas enzim superoxide dismutase dapat digunakan untuk mengukur kadar radikal bebas dan kondisi stres oksidatif dalam tubuh (Kumar dkk., 2012).

Antioksidan eksogen juga diperlukan dalam upaya mencegah dampak negatif ROS (Ardhie, 2011). Banyak penelitian antioksidan eksogen seperti *carotenoid*, vitamin, fenol, flavonoid terbukti memiliki efek positif dan bekerja dengan cara yang berbeda-beda (Mandal dkk., 2009). Hidrogen telah diidentifikasi memiliki sifat antioksidan terapeutik dengan secara selektif mengurangi radikal bebas yang bersifat sitotoksik dalam jaringan. Cara pemberian hidrogen yaitu dengan inhalasi, asupan oral air kaya hidrogen, maupun injeksi hidrogen-saline secara intravena (Tamaki dkk, 2016). Asupan oral dari cairan yang mengandung hidrogen merupakan metode penyampaian hidrogen yang realistis untuk dilakukan karena mudah dibuat oleh siapa saja, tidak membutuhkan tempat dan alat khusus, praktis, dan lebih tidak beresiko dibanding pemberian cara lain (Yoneda dkk., 2012).

Review oleh Nakao dkk. (2010) membuktikan konsumsi air kaya hidrogen (*hydrogen rich water*) memiliki efek yang positif. Kang (2011) pada

penelitiannya, menunjukkan bahwa konsumsi HRW selama 6 minggu terbukti menurunkan radikal bebas dalam darah dan menjaga *blood oxygen potential* sehingga secara signifikan meningkatkan kualitas hidup penderita tumor hati. Penelitian oleh Ignacio dkk. (2013), konsumsi HRW menunjukkan penurunan titer sitokin penyebab atopik dermatitis. Penelitian Tamaki dkk., (2015) mengenai penyembuhan luka pada mukosa palatal tikus menunjukkan bahwa asupan hidrogen dapat meningkatkan produksi *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) yang mengaktivasi terbentuknya antioksidan untuk menekan stres oksidatif secara sistemik pada tubuh, menurunkan titer sitokin proinflamasi dan meningkatkan gen yang berhubungan dengan penyembuhan luka pada tikus. Penelitian yang sudah dilakukan membuktikan bahwa HRW dapat berefek positif terhadap berbagai penyakit dan kemungkinan dapat dikembangkan untuk penyembuhan luka operasi di bidang bedah mulut.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, timbul suatu permasalahan yaitu :

Apakah terdapat pengaruh pemberian *hydrogen rich water* secara oral terhadap kadar enzim *superoxide dismutase* dan jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka pasca eksisi kulit tikus.

### **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *hydrogen rich water* secara oral terhadap kadar enzim *superoxide dismutase* dan jumlah neutrofil pada luka pasca eksisi kulit tikus.

### **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diinginkan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian *hydrogen rich water* secara oral terhadap kadar enzim *superoxide dismutase* dan jumlah neutrofil luka pasca eksisi kulit tikus.
2. Memberikan informasi ilmiah mengenai potensi *hydrogen rich water* sebagai asupan antioksidan tambahan pada penyembuhan luka pasca operasi.

### **E. Keaslian Penelitian**

Penelitian mengenai hubungan *hydrogen rich water* dengan penyembuhan luka yang telah dilakukan, antara lain:

1. “*Hydrogen-Rich Water Intake Accelerates Oral Palatal Wound Healing via Activation of the Nrf2/Antioxidant Defense Pathways in a Rat Model*” yang dilakukan oleh Tamaki dkk. (2015), meneliti mengenai efek asupan *hydrogen rich water* pada penyembuhan luka mukosa pada tikus dengan kajian imunohistologis.
2. “*Beneficial Effects of Hydrogen-Rich Saline on Early Burn-Wound Progression in Rats*” yang dilakukan oleh Guo dkk. (2015), mengenai efek konsumsi *hydrogen rich water* pada penyembuhan luka bakar pada tikus.

3. “*Effect of Drinking Hydrogen-Rich Water on the Quality of Life of Patient Treated with Radiotherapy for Liver Tumors*” dilakukan oleh Kang dkk. (2011), mengenai penilaian kualitas hidup pada pasien yang dilakukan terapi radioterapi untuk pengobatan tumor hati setelah diberikan *hydrogen rich water*.

Ketiga penelitian diatas adalah mengenai hubungan asupan *hydrogen rich water* terhadap penyembuhan luka, namun penelitian tentang pengaruh asupan *hydrogen rich water* secara oral terhadap kadar enzim *superoxide dismutase* dan jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka pasca eksisi kulit tikus sejauh pengetahuan peneliti belum pernah dilakukan.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Telaah Pustaka**

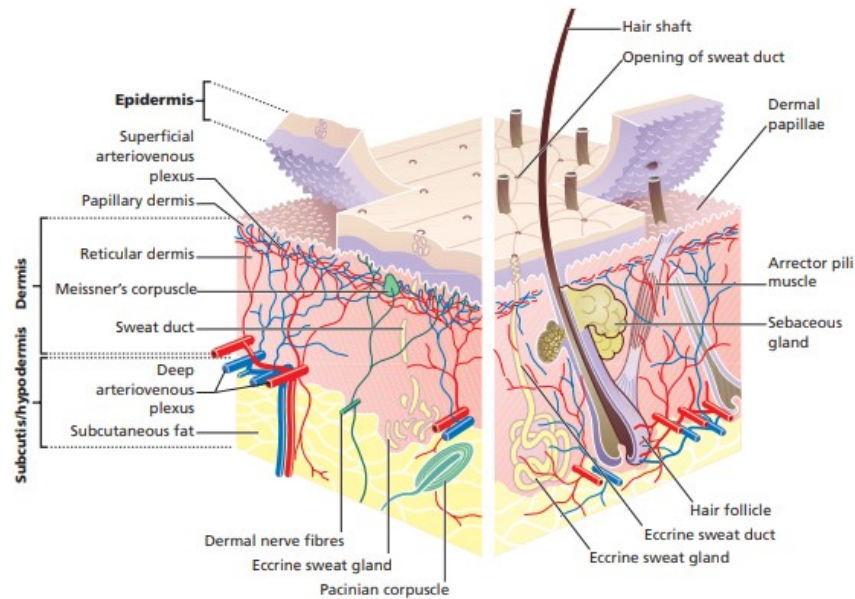
##### **1. Kulit**

Kulit merupakan bagian terluar dari tubuh manusia, dan merupakan organ terbesar dalam bentuk berat maupun luas permukaan. Kulit memiliki luas permukaan kurang lebih 1,6-2 m<sup>2</sup> pada orang dewasa dan merepresentasikan 8-15% dari total berat badan. Kulit memiliki struktur kompleks yang tersusun dari berbagai komponen. Lapisan kulit tersusun dari sel, serat, dan komponen lain yang membentuk struktur berlapis. Struktur ini juga berisikan vena, kapiler dan saraf (Kanitakis, 2002; Kolarsick dkk., 2009).

Fungsi utama dari kulit adalah sebagai pelindung dari lingkungan luar tubuh. Kulit melindungi dari gesekan dan benturan dengan sifatnya yang fleksibel dan kuat. Bahan kimia berbahaya, bakteri, virus, serta ultraviolet dapat dicegah masuk ke dalam tubuh oleh kulit. Fungsi lain adalah mencegah kehilangan cairan dan regulasi temperatur tubuh dari penguapan dan keringat (Igarashi dkk., 2005).

Lapisan yang menyusun kulit adalah epidermis, dermis, dan subkutan (gambar 1). Epidermis tersusun dari sel epitel bertingkat dan dermis yang menyokongnya tersusun dari jaringan ikat. Dermis memiliki jaringan hipodermis dibawahnya, yaitu lapisan lemak yang disebut juga subkutan yang dipisahkan dengan bagian tubuh lain dengan otot lurik (McGrath dkk, 2010).





**Gambar 1.** Struktur kulit manusia (Weller dkk, 2015)

#### a. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan terluar dari kulit, tersusun dari epitel sel berlapis pipih dan lapisan tanduk. Lapisan ini hanya berisi jaringan epitel saja, tidak terdapat vena maupun kapiler (Kalangi, 2013). Ketebalan epidermis sekitar 0,2 mm dan bervariasi tergantung area tubuh. Epidermis dibagi menjadi 5 sublapisan, yaitu dari luar ke dalam: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, dan paling bawah *stratum basal* (gambar 2) (Igarashi dkk., 2005).

##### 1) *Stratum corneum*

*Stratum corneum* merupakan lapisan terluar dari epidermis. Bagian ini terdiri dari corneosit, yaitu sel pipih hexagonal tanpa nukleus. Ketebalan dari *stratum corneum* adalah sekitar 10-25 mikrometer (Weller

dkk., 2015). Sel pada permukaan *stratum corneum* merupakan lapisan tanduk terdehidrasi yang selalu mengelupas (Mescher, 2011).

## 2) *Stratum lucidum*

*Stratum lucidum* merupakan lapisan tipis yang terbentuk oleh 2 hingga 3 lapis sel pipih yang transparan. Keratinosit dari lapisan ini terbungkus oleh protein yang disebut eleidin. Lapisan ini juga tidak memiliki inti (Kalangi, 2013).

## 3) *Stratum granulosum*

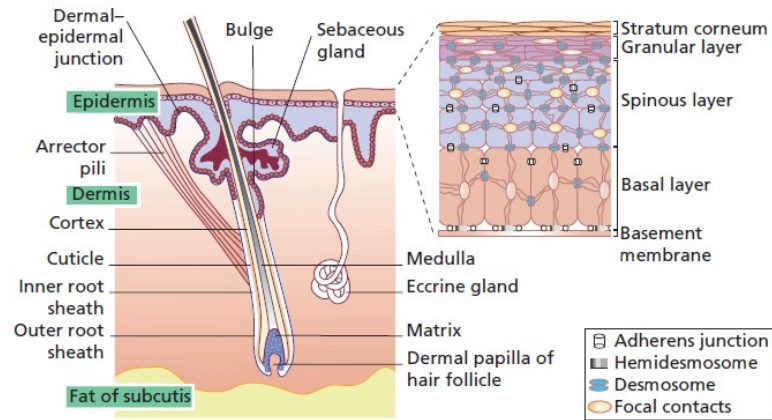
Bagian ini tersusun dari beberapa lapisan sel pipih yang banyak terdapat granula keratohialin di dalamnya. Granula keratohialin memiliki struktur partikel berbentuk ireguler (Weller dkk, 2015).

## 4) *Stratum spinosum*

Lapisan ini merupakan lapisan yang paling tebal. Terdiri atas lapisan sel yang besar, bentuk poligonal, inti lonjong dan sitoplasma berwarna kebiruan. Nukleus dan sitoplasma lapisan ini aktif mensintesa filamen keratin (Kalangi, 2013).

## 5. Stratum basal

Lapisan yang terletak paling dalam dari epidermis. Terdiri atas satu lapis sel kuboid atau kolumnar basofilik yang tersusun berderet di atas membran basal dan melekat pada dermis di bawahnya (Mescher, 2017).



**Gambar 2.** Susunan lapisan kulit (McGrath dkk., 2010)

Epidermis juga tersusun atas sel – sel lain yang mendukung didalamnya. Keratinosit merupakan sekitar 85% sel epidermis, sel lainnya adalah melanosit, sel Langerhans, dan sel Merckell.

1) Melanosit, adalah sel yang memproduksi melanin. Sel ini juga ditemukan pada rambut dan retina. Setiap dendrit melanosit merikatan dengan keratinosit membentuk unit epidermal melanin.

2) Sel Langerhans, adalah sel tipe dendrit seperti melanosit. Sel ini memiliki peran penting dalam reaksi imun, dengan mekanisme kerja mengambil antigen eksogen, memproses dan membawanya ke limfosit T baik pada kulit maupun limfonodi.

3) Sel Merckell, adalah sel yang berperan sebagai transduktor sentuhan ringan. Sel ini non dendritik, berada pada dekat lapisan basal, dan memiliki ukuran sama dengan keratinosit (Weller dkk., 2015).