

EFEK SITOTOKSIK MADU DAN SILVER DRESSING TERHADAP SEL FIBROBLAS DALAM MEDIA TINGGI GLUKOSA: STUDI IN VITRO

Januar Rizqi^{*)}, Denny Agustiningih^{**)}, Dwi Aris Agung^{**)}, Nur Arfian^{**)}

^{*)}Program Studi S1 Ilmu Keperawatan, Universitas Respati Yogyakarta

^{**)}Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Penyembuhan luka diabetes merupakan proses yang unik dan kompleks. Sejumlah dressing dikembangkan untuk mengetahui manfaat yang diharapkan meningkatkan proses penyembuhan. Penelitian *in vivo* maupun *in vitro* madu dan silver menunjukkan hasil yang berbeda. Diperlukan penelitian lebih lanjut aktifitas sitotoksik madu dan silver terhadap sel fibroblas dalam media tinggi glukosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah madu dan silver bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblast dalam media tinggi glukosa. Jenis penelitian ini adalah kuasi eksperimental dengan *post test only design*. Kultur sel fibroblast di uji sitotoksik dengan menggunakan metode MTT Assay secara *in vitro*. Kelompok penelitian dibagi menjadi kelompok madu dengan konsentrasi 6%, 3% 1.5% dan kelompok Silver. Silver memiliki efek sitotoksik terhadap sel fibroblas dengan nilai penghambatan sebesar 100%. Madu dengan konsentrasi 6% dan 3% memiliki nilai penghambatan lebih dari 50%. Madu konsentrasi 1,5% menunjukkan proses penghambatan kurang dari 50% dan meningkatkan proses proliferasi sel fibroblas dalam media tinggi glukosa. Madu memiliki aktifitas sitotoksik yang lemah terhadap sel fibroblas dan dapat meningkatkan proliferasi sel, sedangkan silver memiliki aktifitas sitotoksik yang kuat terhadap sel fibroblast.

Kata Kunci : Sitotoksik; Madu; Silver; Sel Fibroblas; Media Tinggi Glukosa

Abstract

[Cytotoxic Effects Of Honey And Silver Dressing On Fibroblast Cells In High Glucose Media: Study In Vitro]. Diabetic wound healing is a unique and complex process. A number of dressings are developed to find out the benefits expected to improve the healing process. Research *in vivo* and *in vitro* honey and silver showed different results. Further research is needed on the cytotoxic activity of honey and silver on fibroblast cells in high-glucose media. This study aims to determine whether honey and silver are cytotoxic to fibroblast cells in high-glucose media. This type of research is quasi-experimental with *post test only design*. Fibroblast cell culture was cytotoxic by using the MTT Assay method *in vitro*. The research group was divided into honey groups with concentrations of 6%, 3% 1.5% and Silver groups. Silver has a cytotoxic effect on fibroblast cells with an inhibitory value of 100%. Honey with a concentration of 6% and 3% has an inhibitory value of more than 50%. A concentration of 1.5% honey directed the inhibition process of less than 50% and increased the process of proliferation of fibroblast cells in high-glucose media. Honey has weak cytotoxic activity against fibroblast cells and can increase cell proliferation, while silver has strong cytotoxic activity against fibroblast cells.

Keywords: Cytotoxic; Honey; Silver; Fibroblast Cells; High Glucose Media

Article info: Sending on April 20, 2019; Revision May 06, 2019; Accepted on May 25, 2019

*) Corresponding author:

Email : Arizqi.januar@gmail.com

1. Pendahuluan

Proses penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks dan rumit. Luka akut bisa berpotensi menjadi luka kronis jika dalam penanganannya tidak tepat (Eming *et al.*, 2014). Tenaga kesehatan diharuskan memiliki pemahaman menyeluruh tentang intervensi seperti pemilihan dressing yang tepat agar

luka kembali ke proses penyembuhan secara fisiologis (Sood *et al.*, 2014).

Sejumlah dressing baru telah banyak dikembangkan untuk mempromosikan penyembuhan luka. Dressing yang ideal harus memastikan luka tetap lembab, bebas infeksi, bebas dari bahan kimia beracun, mempunyai suhu dan pH optimum untuk penyembuhan (Paddle-Ledinek *et al.*, 2006). Menurut

Morin dan Tomaselli (2007) terdapat empat prinsip dasar yang terlibat dalam memilih dressing yang optimal. Jika luka kering maka luka membutuhkan hidrasi. Jika luka menghasilkan eksudat yang berlebihan, maka cairan perlu diserap. Jika luka memiliki jaringan nekrotik, maka diperlukan manajemen debridemen. Terakhir, jika luka terinfeksi, perlu diobati dengan agen antibakteri yang sesuai (Morin dan Tomaselli, 2007)

Menurut Du Toit dan Page (2009), penggunaan dressing silver dan madu mempunyai keuntungan dan kerugian dalam penyembuhan luka. Khasiat madu dalam penyembuhan luka dikaitkan dengan sifat antimikroba dan anti-inflamasi. Madu juga mempunyai kemampuan menghilangkan bau dan berfungsi sebagai debridemen autolitik dilindungi yang lembab. Namun, mekanisme kerja madu dalam mempercepat penyembuhan luka ditingkat sel masih dalam penyelidikan, sementara penggunaan dressing silver menyebabkan perubahan ditingkat sel.

Penggunaan silver dalam perawatan luka karena meningkatnya ancaman resistensi antibiotik dan meningkatnya toksisitas antiseptik topikal. Saat ini, Dressing silver tersedia dalam bentuk busa, hydro fibers dan hydrocolloid. Silver dianggap sebagai agen antimikroba yang sangat kuat (Zou *et al.*, 2013). Silver juga menunjukkan aktifitas yang kuat terhadap bakteri gram negatif yang dapat membuat kolonisasi diluka kronik yang beresiko infeksi, termasuk kasus ulkus kaki diabetes.

Penelitian ini dilakukan untuk menguji sitotoksitas dressing silver dan madu pada sel fibroblas secara *in vitro*. Fibroblas dermal dari tikus diabetes dipilih karena fibroblas merupakan komponen seluler utama dari proses penyembuhan luka (Du Toit dan Page, 2009). Selain itu dalam penelitian ini digunakan media tinggi glukosa untuk memberikan kondisi hiperglikemia pada sel fibroblas (Lamers *et al.*, 2011). Hiperglikemia meningkatkan produksi *advanced glycosylation end* (AGE) dan *reactive oxygen species* (ROS) berdampak pada penyembuhan luka secara normal menjadi terganggu.

2. Bahan dan Metode

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan rancangan kuasi eksperimental post test only desain. Madu hutan Kalimantan dan dressing silver Acticoat produk dari Smith & Nephew merupakan bahan utama dalam penelitian ini. Dressing silver berfungsi sebagai kontrol dari perlakuan madu. Prosedur penelitian telah mendapatkan izin dari Komisi Etik Penelitian dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.

Pembuatan kultur fibroblas berasal dari jaringan dermis tikus model diabetes. Tikus model diabetes didapatkan dengan cara induksi, yaitu memberikan injeksi 60 mg/kgBB Streptozotocin (STZ) (dalam buffer sitrat, pH 4,5) dan pemberian 120 mg/kgBB Nikotinamida (NA) (dalam normal

saline) secara ip. Tikus dianggap DM setelah kadar glukosa plasma puasa > 126 mg/dl setelah 7 hari pemberian STZ dan NA. Fibroblas diperoleh dengan cara memisahkan bagian epidermis dan dermis kemudian di potong menjadi 1mm, diinkubasi dalam Dubecco's Minimal Essential Medium (DMEM, Gibco). Selain itu juga ditambahkan dengan 10% Foetal Bovine Serum (FBS, Sigma), 1% Penstrep dan 0,5% fungizone kemudia diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Sebelum perlakuan, fibroblas akan diinkubasi dalam media tinggi glukosa selama 24 jam. Fibroblas akan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan dressing silver, madu konsentrasi 3%, madu konsenutrasi 1,5% dan madu konsenutrasi 0,75%.

Pembuatan larutan uji madu konsentrasi 3%, 1,5% dan 0,75% dilakukan dengan cara membuat larutan stok 30% sebanyak 10 mL terlebih dahulu. Jika madu murni mempunyai konsentrasi awal 100%, maka untuk membuat larutan stok sebanyak 10 mL adalah $V_1 \times 100\% = 10 \text{ mL} \times 30\%$ (dengan perhitungan $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$). $V_1 = 3\text{mL}$. Jadi, pembuatan stok 30% dilakukan dengan memasukan madu kedalam tabung konikal sebanyak 3mL dari madu 100% kemudian ditambahkan 7mL media lengkap DMEM tinggi glukosa sebanyak 7ml. Larutan uji 3%, 1,5% dan 0,75% dilakukan seperti membuat larutan stok 30%. Larutan uji dressing silver dibuat dengan cara memasukan potongan Acticoat dengan ukuran 1,41cm x 1,41cm kedalam tabung konikal, kemudian tambahkan media lengkap DMEM tinggi glukosa sebanyak 8mL. Larutan uji diinkubasi pada 5% CO₂ dalam suhu 37°C selama 24 jam (Tshukudu *et al.*, 2010).

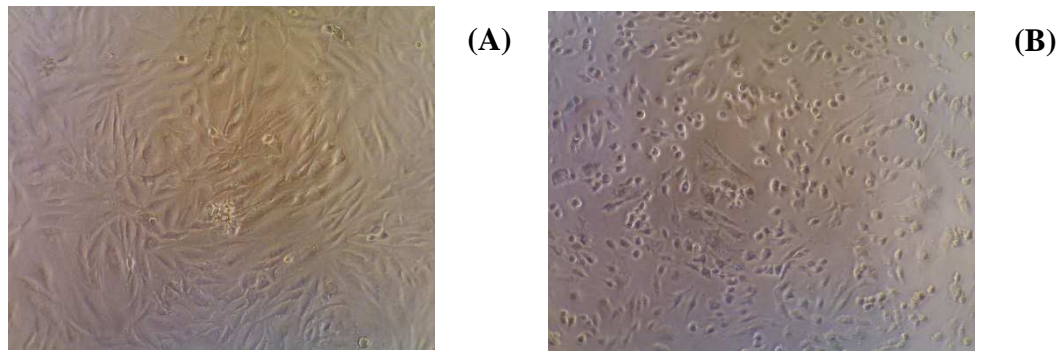
Uji Aktivitas sitotoksik secara *in vitro* dilakukan dengan MTT assay [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium-bromida]. Fibroblas dipanen dari *dish* dengan menambahkan tripsin 0,25% agar sel terlepas dari dinding *dish*. Pembuatan suspensi fibroblas dilakukan dengan penambahan media lengkap DMEM, kemudian hitung jumlah sel dengan menggunakan bilik hitung *haemocytometer*. Suspensi fibroblas sebanyak 100µL berisi 2×10^5 sel/mL dimasukan kedalam sumuran 96 *microplate* menggunakan mikro pipet (Ecopipette®), kemudian diinkubasi dalam inkubator pada 5% CO₂ dalam suhu 37°C selama 24 jam. Fibroblas diberikan perlakuan silver dressing dan madu konsentrasi 3%, 1,5% dan 0,75% dan diinkubasi selama 48 jam. Pada tahap akhir inkubasi, tambahkan 100µL media DMEM yang mengandung MTT 5mg/mL kemudian inkubasi kembali selama 3 jam pada suhu 37°C. Fibroblas akan membentuk kristal formazan yang berwarna ungu, kemudian tambahkan reagen stopper *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% dalam HCl 0,01N dan di tutup dengan aluminium foil, Simpan ditempat gelap selama 24 jam. Pembacaan hasil MTT menggunakan *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) *reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

3. Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa kultur sel fibroblas dari jaringan tikus DM dapat hidup dan menempel di *dish* pada hari ke-5. Proliferasi fibroblas mencapai konflen 90% dua minggu setelah sel menempel di *dish* kultur. Fibroblas terlihat seperti gepeng memanjang, terdapat

inti yang memanjang dan ovoid yang dilihat menggunakan mikroskop inversi.

Hasil pengamatan mikroskopis setelah perlakuan pada kelompok madu terlihat fibroblas lebih banyak dan lebih padat (Gambar 1.A). Pemberian silver mengakibatkan perubahan morfologi sel dan terlihat sel fibroblas lebih sedikit dibandingkan kelompok madu (Gambar 1.B).



Gambar 2. Gambaran mikroskopis sel fibroblas 24 jam setelah perlakuan pada (A) kelompok madu dan (B) pada kelompok silver dilihat dengan pembesaran 100x lensa obyektif.

Tabel 1. Nilai rata-rata persentase penghambatan proliferasi sel fibroblas semua kelompok perlakuan

Bahan uji	Konsentrasi (%)	Persentase hambat proliferasi sel (%)			Rata-rata Hambatan (%)
		Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	
		Hambatan (%)	Hambatan (%)	Hambatan (%)	
Madu	6	94,50	95,15	76,63	88,76
	3	56,78	65,56	45,83	56,06
	1,5	16,30	26,79	23,54	22,21
Silver	100	99,65	100,00	100,00	100,00

Tabel 2. Nilai rata-rata persentase sel sel fibroblas setelah inkubasi selama 24 jam untuk semua kelompok perlakuan.

Perlakuan	Konsentrasi (%)	Rata-rata hambatan (%) ± SD	Nilai p
Madu	6	88,76 ± 5,37	0,000*
	3	56,06 ± 9,88 ^a	
	1,5	22,21 ± 10,51 ^a	
Silver	100	100,00 ± 1,19	

Berdasarkan tabel 1, dapat dilihat bahwa pemberian madu konsentrasi 6% dan 3% menghambat lebih dari 50% proliferasi sel fibroblast. Sedangkan koonsentrasi 1,5% menghambat kurang dari 50% yaitu sebesar 22,21%. Pemberian silver menghambat proliferasi sel fibroblast sebesar 100%.

Hasil uji ANOVA antara madu 3%, 1,5% dan silver menunjukkan nilai p=0,000 (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok madu dan kelompok silver. Aktifitas sitotoksik kelompok madu terhadap sel fibroblast lebih rendah dibandingkan kelompok silver.

4. Pembahasan

Efek madu dan silver dievaluasi pada sel fibroblas yang dikultur dari jaringan dermis tikus diabetes selama 24 jam. Sel fibroblast diinkubasi dalam media tinggi glukosa untuk melihat respon sitotoksik pada sel fibroblast. Pemberian media tinggi glukosa (25mM) menyebabkan toksik sel karena

peningkatan ROS. Peningkatan ROS menyebabkan kerusakan protein dan asam nukleat sel sehingga sel mengalami apoptosis (Lamers *et al.*, 2011). Xuan *et al.* (2014) dalam penelitiannya juga menemukan bahwa pemberian media tinggi glukosa menyebabkan penurunan proliferasi sel fibroblas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proliferasi sel pada kelompok madu terlihat lebih baik dibandingkan dengan kelompok silver. Pada penelitian ini, pemberian madu konsentrasi 6% dan 3% menimbulkan efek sitotoksik terhadap fibroblas dengan penghambatan lebih dari 50%. Sedangkan konsentrasi 1,5% menunjukkan peningkatan proliferasi lebih dari 50% dan menunjukkan efek sitotoksik lebih rendah terhadap sel fibroblas dalam media tinggi glukosa. Paparan dressing silver pada sel fibroblas dalam media tinggi glukosa berpotensi menyebabkan sitotoksik terhadap perkembangan sel dengan penghambatan sebesar 100%.

Pemberian madu pada beberapa penelitian in vitro dapat meningkatkan proliferasi dan meningkatkan penyembuhan luka secara in vivo. Penelitian Munshi *et al.* (2014) melaporkan bahwa pemberian madu konsentrasi tinggi (100% dan 50%) dapat menyebabkan masalah kontaminasi dan menghambat peningkatan proliferasi. Penggunaan dressing madu secara in vivo menunjukkan hasil yang baik, namun ada juga laporan yang menunjukkan hasil yang tidak baik terhadap penyembuhan luka. Menurut Günes dan Eser (2007) bahwa pemberian madu mempercepat waktu penyembuhan luka empat kali lebih cepat dibandingkan kontrol pada pressure ulcer. Sedangkan menurut Jull *et al.* (2008) pemberian madu pada luka kronis seperti kasus ulkus vena kaki menunjukkan penurunan penyembuhan luka dibandingkan dengan perawatan luka standar dan kompresi.

Madu digunakan sebagai dressing luka karena memiliki sifat antiinflamasi, antimikrobal dan antioksidan yang berasal dari flavonoid, polifenol dan vitamin C. Menurut Sherlock *et al.* (2010) bahwa antioksidan dapat mengurangi kelebihan radikal bebas, menstimulus sitokin dan faktor pertumbuhan tertentu seperti vascular endothelial growth factor (VEGF), TNF- α , TGF, yang akan memicu peningkatan jumlah sel. Selain itu, madu dengan paparan konsentrasi yang tepat akan menghasilkan kelembaban dilindungi luka untuk meningkatkan proliferasi dan migrasi sel fibroblas.

Silver telah banyak digunakan sebagai dressing penyembuhan luka karena memiliki cakupan antibiotic spektrum luas pada organisme yang resisten antibiotic dan aman digunakan pada luka kronis maupun luka bakar (Munteanu *et al.*, 2016). Ion silver bermuatan sangat reaktif (Ag^+) bereaksi dengan mengikat partikel bermuatan negatif seperti protein, DNA, RNA, dan ion klorida yang bertanggung jawab sebagai agen microbial (Murphy dan Evans, 2012). Silver juga dilapisi dengan nanokristalin (<20nm) yang bermuatan (Ag^0) berfungsi untuk membantu menjaga kelembaban luka. Kation perak bebas memiliki efek antimikroba yang kuat yang segera menghancurkan mikroorganisme dengan memblokir respirasi seluler dan mengganggu fungsi membran sel bakteri. Ini terjadi ketika kation perak mengikat protein jaringan, menyebabkan perubahan struktural pada membran sel bakteri yang pada gilirannya menyebabkan kematian sel. Kation perak juga mengikat dan mendenaturasi DNA bakteri dan RNA, sehingga menghambat replikasi sel (Munteanu *et al.*, 2016; Murphy dan Evans, 2012).

Secara in vitro, silver sangat efektif untuk membunuh bakteri namun dapat juga menyebabkan kerusakan sel yang sehat. Lam *et al.* (2004) melaporkan bahwa silver dapat menghambat pertumbuhan sel keratinosit, berdampak pada sel fibroblast dan keterlambatan reepitelisasi. efek sitotoksik silver juga ditemukan dalam penelitian ini,

bahwa silver menyebabkan kerusakan dan penurunan proliferasi sel fibroblast.

Secara klinis, silver efektif dalam manajemen luka dilihat dari segi biaya, mengurangi infeksi luka, mengurangi frekuensi perubahan pembalut, mengurangi tingkat nyeri, menurunkan aktivitas matrix metalloproteinase dan mempromosikan penyembuhan luka pada luka kronis (Fong dan Wood, 2006). Meskipun tidak ada bukti in vivo yang menunjukkan bahwa silver toksik bagi keratinosit dan fibroblast manusia, namun ada bukti in vitro yang menunjukkan hal sebaliknya. Oleh karena itu, silver harus digunakan dengan hati-hati pada luka epitelisasi dan proliferasi (Fong dan Wood, 2006).

5. Kesimpulan dan saran

Madu konsentrasi 1.5% mempunyai aktifitas sitotoksik pada sel fibroblas kurang dari 50% yaitu sebesar 22,21%. Silver mempunyai aktifitas sitotoksik yang kuat sehingga menghambat proliferasi sel dengan nilai sebesar 100%. Pemilihan silver harus digunakan secara hati-hati untuk luka yang tidak infeksi. Kontrol glikemik pasien diabetes juga diperlukan agar proses penyembuhan luka lebih maksimal.

6. Referensi

- Du Toit, D.F., Page, B.J., 2009. An in vitro evaluation of the cell toxicity of honey and silver dressings. *J. Wound Care* 18, 383–389. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.9.44307>
- Eming, S.A., Martin, P., Tomic-Canic, M., 2014. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* 6, 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Fong, J., Wood, F., 2006. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *Int. J. Nanomedicine* 1, 441–449. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.441>
- Günes, Ü.Y., Eser, I., 2007. Effectiveness of a honey dressing for healing pressure ulcers. *J. Wound. Ostomy Continence Nurs.* 34, 184–190.
- Jull, A., Walker, N., Parag, V., Molan, P., Rodgers, A., Honey as Adjuvant Leg Ulcer Therapy trial collaborators, 2008. Randomized clinical trial of honey-impregnated dressings for venous leg ulcers. *Br. J. Surg.* 95, 175–182. <https://doi.org/10.1002/bjs.6059>
- Lam, P.K., Chan, E.S.Y., Ho, W.S., Liew, C.T., 2004. In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (Acticoat) on cultured keratinocytes. *Br. J. Biomed. Sci.* 61, 125–127. <https://doi.org/10.1080/09674845.2004.11732656>

- Lamers, M.L., Almeida, M.E.S., Vicente-Manzanares, M., Horwitz, A.F., Santos, M.F., 2011. High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022865>
- Morin, R.J., Tomaselli, N.L., 2007. Interactive dressings and topical agents. *Clin. Plast. Surg.* 34, 643–658. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2007.07.004>
- Munshi, R., 2014. Exploration of the Angiogenic Potential of Honey. *Br. J. Pharm. Res.* 4, 477–489. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2014/6930>
- Munteanu, A., Florescu, I., Nitescu, C., 2016. A modern method of treatment: The role of silver dressings in promoting healing and preventing pathological scarring in patients with burn wounds. *J. Med. Life* 9, 306–315.
- Murphy, P.S., Evans, G.R.D., 2012. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plast. Surg. Int.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/190436>
- Paddle-Ledinek, J.E., Nasa, Z., Cleland, H.J., 2006. Effect of Different Wound Dressings on Cell Viability and Proliferation. *Plast. Reconstr. Surg.* 117, 110S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225439.39352.ce>
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., Humphreys, H., 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 47. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-47>
- Sood, A., Granick, M.S., Tomaselli, N.L., 2014. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv. Wound Care* 3, 511–529. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0401>
- Tshukudu, G.M., van der Walt, M., Wessels, Q., 2010. Comparative in vitro study of honey based and silver based wound preparations on cell viability. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* 36, 1036–1041. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.01.016>
- Xuan, Y.H., Huang, B.B., Tian, H.S., Chi, L.S., Duan, Y.M., Wang, X., Zhu, Z.X., Cai, W.H., Zhu, Y.T., Wei, T.M., Ye, H.B., Cong, W.T., Jin, L.T., 2014. High-Glucose Inhibits Human Fibroblast Cell Migration in Wound Healing via Repression of bFGF-Regulating JNK Phosphorylation. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108182>
- Zou, S.-B., Yoon, W.-Y., Han, S.-K., Jeong, S.-H., Cui, Z.-J., Kim, W.-K., 2013. Cytotoxicity of silver dressings on diabetic fibroblasts. *Int. Wound J.* 10, 306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2012.00977>