

**LESI PATOLOGIK ORGAN DAN JARINGAN IKAN NILA (*Oerochromis niloticus*)  
YANG DIINFEKSI BAKTERI *Staphylococcus sp.***

**PATHOLOGIC LESION OF THE ORGAN FROM NILA FISH (*Oerochromis niloticus*)  
INFECTED BY *Staphylococcus sp.***

**Bambang Sutrisno dan Yuli Purwandari K.**

**Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada**

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lesi/perubahan patologik organ dan jaringan ikan nila yang diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus sp* melalui route injeksi yang berbeda. Seratus ekor ikan nila dengan ukuran panjang  $\pm 10$  cm yang dibagi dalam 10 kelompok dan ditempatkan ke dalam aquarium yang berisi 20 liter air. Ikan pada kelompok I sampai V, diinjeksi dosis tunggal bakteri *Staphylococcus sp.* sebanyak  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{15}$  sel/ml secara intraperitoneal (IP). Ikan pada kelompok VI sampai X, diinjeksi dosis tunggal bakteri *Staphylococcus sp.* sebanyak  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{15}$  sel/ml secara intramuskuler (IM). Pengamatan dilakukan tiap hari dengan melihat jumlah kematian, gejala dan perubahan patologis anatomis dan histopatologis selama 16 hari dan data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa a) Infeksi buatan bakteri *Staphylococcus sp.* pada ikan nila akan menimbulkan kematian yang tinggi hingga 80% secara intraperitoneal, b) Injeksi secara intraperitoneal menunjukkan gejala sakit dan kematian yang lebih cepat dibandingkan dengan injeksi intramuskuler, dan c) Injeksi secara intraperitoneal dapat menimbulkan nekrosis pada hati, tetapi tidak menunjukkan adanya lesi cutaneus

**Kata kunci:** Lesi, organ, ikan nila, *Staphylococcus sp.*

**ABSTRACT**

This research aimed to know lesion pathologic of the organ and tissue from nila fish (*Oerochromis niloticus*) which infected by *Staphylococcus sp* with various route injection. One hundred nila fishes of 10 cm length were divided into 10 group, one group contained for 10 nila fishes which were placed into 20 litre water. Fish of group I until V were infected by *Staphylococcus sp.* as  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{15}$  cell by single dose intraperitoneal (IP) injection. Fish of group VI until X, were infected by *Staphylococcus sp.* as  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{15}$  cell by single dose intramuskular (IP) injection. The clinical sign, death and pathologic lesion have been seen for 16 and made histopathologic slide. The results show that a) Infected nila fish (*Oerochromis niloticus*) by *Staphylococcus sp.* would cause the highest death till 80% by intraperitoneal injection. b) Infected intraperitoneal showed the the clinical signs and faster death than intramuskuler injection. c) intraperitoneal Injection can cause a necrosis in the liver, but not to cutaneous lesion.

**Keyword:** Lesion, fish, *Staphylococcus Sp.*

**PENDAHULUAN**

Bakteri bentuk coccus seperti *Streptococcus sp* dan *Staphylococcus sp.* akhir-akhir ini telah banyak ditemukan pada ikan sakit. Kebanyakan kedua spesies tersebut hidup sebagai saprofitik dan beberapa sebagai mikroflora normal di dalam saluran pencernaan hewan dan berikutnya dilepaskan bersamaan dengan feses. Keberadaannya di lingkungan aquatik biasanya sebagai indikator kontaminasi feses terhadap air (Pelezar dan Reid, 1958). *Staphylococcus sp.* bukan merupakan penyebab utama sebagai penyakit pada perikanan di Amerika, tetapi sebagai penyebab utama pada kerugian pada petani ikan di Jepang, Taiwan dan negara-negara timur jauh (Varvarigos, 2001).

Infeksi *Staphylococcus sp.* pada ikan jarang terjadi, walaupun demikian pernah diisolasi dari darah jantung pada ikan salmon sakit di Argentina (Conroy, 1966). Isolat tersebut telah diinjeksikan secara intraperitoneal dan tidak memperlihatkan adanya perubahan patologik pada organ ikan mas. Pada ikan *Lepomis microlophus*, infeksi *Staphylococcus sp.* menyebabkan beberapa lesi berupa : nekrosis dan oedema di muskulus, hemoragi petechial di mesenterium dan intestinal serta adanya timbunan cairan darah pada cavitas vaseralis. Selanjutnya Schaperclaus (1992) menyatakan bahwa isolat yang didapat dari ikan apabila disuntikkan secara intra peritoneal pada ikan sejenis tidak menunjukkan perubahan patologi. Selanjutnya studi yang dilakukan oleh peneliti bertujuan untuk mengetahui dampak, lesi/perubahan patologik baik secara makroskopik ataupun mikroskopik pada organ ikan nila yang diinfeksi dengan *Staphylococcus sp.* melalui rute atau metode yang berbeda yaitu intraperitoneal dan intramuskuler.

**MATERI DAN METODE**

Penelitian ini menggunakan 100 ekor ikan nila dengan ukuran panjang  $\pm$  10 cm sebagai hewan perlakuan, bakteri *Staphylococcus sp.* dari isolat Bali yang diisolasi dari lapangan, serta bahan standar untuk pembuatan preparat histologik. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi dan Laboratorium Mikrobiologi FKH UGM.

Sebanyak 100 ikan nila dengan ukuran panjang + 10 cm dialokasikan secara acak ke dalam 10 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor ikan yang ditempatkan ke dalam aquarium yang berisi 20 liter air. Ikan-ikan di dalam kelompok I sampai kelompok V, masing-masing diinjeksi dosis tunggal bakteri *Staphylococcus sp.* yang sudah dipersiapkan menurut metode Mc Farland sebanyak  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ , dan  $10^{15}$  sel/ml secara intraperitoneal (IP). Sedangkan ikan-ikan di dalam kelompok VI sampai dengan kelompok X, masing-masing diinjeksi dosis tunggal bakteri *Staphylococcus sp.* sebanyak  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{13}$ , dan  $10^{15}$  sel/ml secara intra muskuler (IM). Pengamatan dilakukan setiap hari dengan melihat gejala, jumlah kematian, dan perubahan makroskopik dan mikroskopik setelah  $\pm$  2 minggu pasca perlakuan dengan injeksi dosis tunggal bakteri.

Data dari penelitian ini dianalisa secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil infeksi berbagai dosis bakteri *Staphylococcus sp.* dengan metode aplikasi yang berbeda menunjukkan bahwa aplikasi infeksi *Staphylococcus sp.* dengan cara injeksi intraperitoneal lebih cepat memunculkan gejala sakit dan kematian jika dibandingkan dengan aplikasi infeksi dengan cara injeksi intra muskular seperti terlihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil pengamatan perubahan makroskopik dan jumlah kematian ikan pasca infeksi dengan dosis tunggal secara intraperitoneal. Pengamatan dilakukan selama 16 hari**

Kelompok	Mati Hari Ke	$\Sigma$ Mati	Sakit Hari Ke	Lesi/Gejala
I ( $10^7$ )	5,6 dan 7	8 ekor	5	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, lesu dan mengambang
II ( $10^9$ )	4,5,6 dan 8	8 ekor	4	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, lesu dan mengambang
III ( $10^{11}$ )	4,5 dan 6	8 ekor	3	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, lesu dan mengambang
IV ( $10^{13}$ )	4,5,6 dan 7	9 ekor	4	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, lesu dan mengambang
V ( $10^{15}$ )	6,7,8 dan 9	8 ekor	6	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, lesu dan mengambang

**Tabel 2 Hasil pengamatan perubahan makroskopik dan jumlah kematian ikan pasca infeksi dengan dosis tunggal secara intramuskuler. Pengamatan dilakukan selama 16 hari**

Kelompok	Mati hari ke	Σ Mati	Sakit hari ke	Lesi/ Gejala
VI (10 <sup>15</sup> )	-	-	-	-
VII (10 <sup>13</sup> )	9,14,15 dan 16	10 ekor	9	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, ekor nekrosis, dorsal erosi, lesu dan mengambang, berenang pada posisi lateral
VIII (10 <sup>11</sup> )	-	-	-	-
IX (10 <sup>9</sup> )	13 dan 15	10 ekor	13	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, ekor nekrosis, dorsal erosi, lesu dan mengambang, berenang pada posisi lateral
X (10 <sup>7</sup> )	11	1 ekor	11	Abdomen besar, berisi cairan, insang pucat, lesu dan mengambang

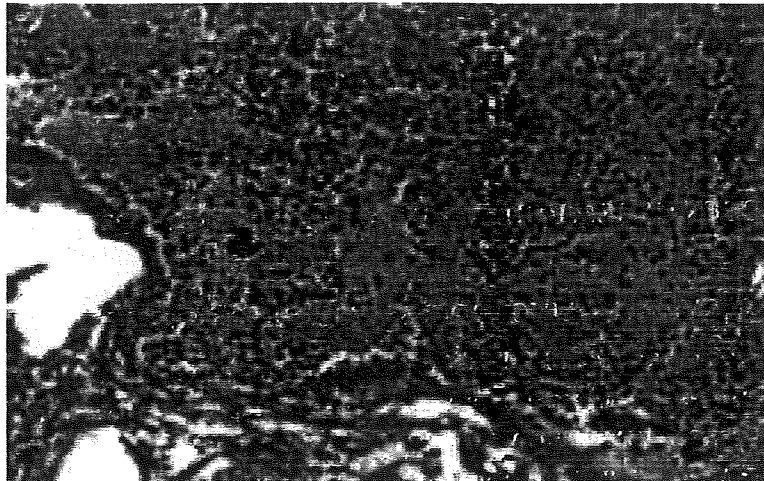
Kematian yang ditimbulkan oleh infeksi buatan dengan berbagai dosis *Staphylococcus sp.* secara intra peritoneal pada ikan nila air tawar (*Oerochromis niloticus*) dapat mencapai angka kematian tinggi yakni seperti tabel 1. di atas mencapai rata-rata 80% pada infeksi decara intraperitoneal. Angka ini jauh lebih besar apabila dibandingkan dengan angka kematian infeksi *Staphylococcus sp.* pada ikan kakap muda (air laut) seperti yang dikemukakan oleh Varvarigos (2001). Hasil penelitian juga berbeda dengan hasil studi dari Conroy (1966) dan Schaperciaus (1992) yang menyatakan bahwa *Staphylococcus sp.* yang terisolasi dari ikan sakit dan kemudian disuntikkan kembali pada ikan dengan jenis yang sama tidak menunjukkan gejala sakit. Menurut Robinson dan Meyer (1900), infeksi buatan dengan injeksi bakteri sebanyak 10<sup>4</sup> 10<sup>5</sup> sel/ml dan 10<sup>6</sup> sel/ml selama 10 menit dapat menimbulkan kematian. Pada beberapa spesies tertentu dapat menyebabkan kematian yang tinggi seperti pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). Infeksi dengan cara injeksi intra muskular dengan berbagai dosis *Staphylococcus sp.* menunjukkan angka kematian dan lama waktu kematian bervariasi seperti terlihat pada tabel 1 dan 2. Sedangkan, Infeksi dengan isolat yang mempunyai virulensi rendah dan dosis rendah dari isolat yang mempunyai virulensi tinggi telah dilaporkan dapat menimbulkan infeksi (Kimura dan Kusuda, 1979).

Lesi makroskopik pada ikan yang diinfeksi oleh *Staphylococcus sp.* baik secara injeksi intraperitoneal maupun injeksi intra muskular berupa: abdomen membesar karena timbunan cairan eksudat, insang pucat karena sirkulasi minimal ke daerah lamella, nekrosis pada sirip ekor, erosi pada kulit di daerah dorsal. Bentuk lesi yang terakhir banyak ditemukan pada ikan yang diinjeksi secara intramuskuler. Perubahan nekrosis sirip ekor dan erosi kulit dapat terjadi sebagai akibat aktivitas toksin, terutama eksotoksin yang dihasilkan oleh bakteri

*Staphylococcus sp.* pendapat ini didukung oleh Pelezar dan Reid (1958), mengatakan bahwa *Staphylococcus sp.* dapat melepaskan beta-toksin dan eksfoliatif toksin yang masing-masing dapat mencegah spingomyelin sel membran dan merusak kulit sehingga terjadi ulcer atau nekrosis jaringan. Sedangkan, menurut Kusuda dan Sugiyama (1981), gejala klinis yang tampak akibat infeksi *Staphylococcus sp.* adalah exophthalmia, kongesti dan ulserasi pada ekor. Hemoragi pada mata. Berenang pada permukaan air / inbalan (Barham skk, 1979).

Infeksi intraperitoneal bakteri *Staphylococcus sp.* dapat menimbulkan kematian lebih cepat (mulai hari ke 4 pasca infeksi) dibandingkan dengan infeksi intra muskuler (mulai hari ke 9 pasca infeksi). Kematian yang cepat disebabkan karena infeksi intra peritoneal langsung menyebabkan kerusakan organ-organ visera seperti hati, ginjal dan jantung. Selain itu di dalam rongga viseral terdapat banyak pembuluh darah sehingga bakteri cepat menyebar melalui pembuluh darah. Sebaliknya pada infeksi intra muskuler, kematian cenderung lebih lambat karena di daerah intra muskuler pembuluh darah lebih sedikit sehingga penyebaran bakteri ke organ-organ vital lebih lambat.

Abdomen membesar dan timbunan cairan eksudat di dalam rongga peritonium, merupakan akibat proses peradangan yang terjadi pada organ yang ada di dalam rongga peritonium, seperti organ hati. Organ hati ikan nila (*Oerochromis niloticus*) yang diinjeksi secara intraperitoneal dengan *Staphylococcus sp.* dapat dilihat pada gambar 1. diatas. Infeksi alami oleh bakteri *Staphylococcus sp.* menyebabkan perubahan pada organ-organ di rongga peritonium. Menurut Varvarigos (2001) bahwa ikan kakap muda yang mati sebagai akibat infeksi *Staphylococcus sp.* menunjukkan perubahan berupa: lambung mengalami distensi, limpa membesar, kantong empedu membesar sebagai akibat *cholecystitis*



Gambar 1. Fotomikrografi hati ikan nila (*Oerochromis niloticus*) yang diinfeksi *Staphylococcus sp.* dengan cara injeksi intra peritoneal terlihat a). daerah nekrosis dan infiltrasi sel radang b). heterofil dan c). mononuklear. (Pengecatan HE, perbesaran 200 x)

dan hati menunjukkan adanya daerah peradangan yang ditandai oleh daerah pucat dan daerah merah gelap.

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa infeksi buatan *Staphylococcus sp.* pada ikan nila air tawar dapat menimbulkan angka kematian tinggi hingga 80%. Injeksi secara intra peritoneal *Staphylococcus sp.* menunjukkan gejala sakit dan kematian lebih cepat dibandingkan dengan injeksi intra muskular *Staphylococcus sp.* Injeksi intraperitoneal *Staphylococcus sp.* tidak menimbulkan lesi cutaneus

#### DAFTAR PUSTAKA

- Barham, W.T., Schoonbee, H and Smit, G.L. 1979. The occurrence of *Aeromonas* and *Streptococcus* in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology* 15. 457-460
- Conroy, DA., 1966. A report on the problem of bacterial fish disease in the Argentine Republic. *Bull. Of int. Epizootic* 65(576): pp. 755-768
- Kimura dan Kusuda, 1979. Studies on the Pathogenesis of Streptococcal infection in cultured yellow tails

*seriola spp*: Effect of Crude exotoxin fractions from cell free culture on experimental Streptococcal infection. *Journal of Fish Disease* 5, 471-478

- Kusuda, R. and Sugiyama, A. 1981. Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes, on morphological, biological and biochemical properties, *Fish Pathology* 16, 15-24
- Pelezar, M.J. and Reid, R.D., 1958. *Microbiology*. McGraw-Hill Book Company Inc. New York, Toronto, London. Pp. 348-349
- Robinson, J.A. and Meyer, F.P. 1966. Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology* 92, 512.
- Schaperclaus, W., 1992. *Fish Disease. Vol.1*, A.A. Balkema, Rotterdam p.583
- Varvarigos, P. 2001. Gram positive cocco-bacteria (*Micrococcaceae, Streptococcaceae*) Causing systemic disease in intensive farmed fish in Greece. [http://www.vetcare.gr/Gram positive cocci.htm](http://www.vetcare.gr/Gram%20positive%20cocci.htm)

# IMPLIKASI STRES PADA PROSES KESEMBUHAN LUKA OPERASI EPISIOTOMI

## THE IMPLICATION OF STRESS ON WOUND HEALING PROCESS OF EPISIOTOMY SURGERY

Dhirgo Adji<sup>1</sup> dan Mulyata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Bedah dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM, Jl. Olah Raga, Karangmalang, Yogyakarta 55281,  
Telp. (0274) 901093.

<sup>2</sup>Departemen Anestesiologi RS. Dr. Moewardi, Jl. Kolonel Soetarto 132, Surakarta, Jawa Tengah,  
Telp. (6271) 639262.

### ABSTRAK

Penelitian pada hewan coba ini dilakukan untuk mengetahui keterlibatan stres pada proses kesembuhan luka. Dua puluh ekor tikus galur *Sprague Dawley* betina dewasa, umur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 300 gram dipergunakan dalam penelitian ini. Tikus dibagi secara acak menjadi 2 kelompok, masing-masing 10 ekor tikus. Kelompok I adalah kelompok tikus kontrol, yaitu tikus yang tidak diberi perlakuan stres, sedangkan kelompok II adalah kelompok tikus yang diberi perlakuan stres. Induksi stres dilakukan menggunakan mesin *vibra cell*, dengan kekuatan suara 6,6 kHz selama 1 menit. Tikus kemudian di episiotomi dengan sayatan dorso lateral sepanjang 0,6 cm mulai dari kulit hingga mukosa vulva, dengan prosedur operasi standar. Luka sayatan dijahit kembali dengan benang *cotton* steril ukuran 000, berjarak 30 mm, model jahitan sederhana tunggal. Operasi dilakukan dengan bantuan anestetikum ketamin-silazin, dosis 90 mg/kg BB ketamin dikombinasikan dengan silazin 10 mg/kg BB, aplikasi intra muskuler. Pada hari ke-3, 10 ekor tikus (5 kontrol dan 5 perlakuan) dibunuh, kemudian diambil sampel jaringan vulvanya untuk dibuat preparat histopatologi, dengan pengecatan hematoxilin-eosin, untuk menghitung jumlah fibroblas pada jaringan luka. Sebagian jaringan juga dibuat preparat imunohistokimia untuk melihat adanya *TGF -1*. Tikus sisanya diperlakukan sama, namun dilakukan pada hari ke 5 pasca operasi. Hasil analisis statistik dengan metoda faktorial 2x2 menunjukkan tidak adanya perbedaan jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dengan perlakuan ( $P > 0,05$ ), namun hasil analisis dengan metoda imunohistokimia streptavidin-biotin menunjukkan bahwa kelompok tikus kontrol (tidak stres) menunjukkan positif *TGF -1* sedangkan tikus perlakuan (stres) negatif *TGF -1* pada jaringan, baik yang diambil pada hari ke 3 maupun ke 5 pasca operasi. Dari keseluruhan hasil penelitian disimpulkan bahwa tikus stres akan mengalami perpanjangan masa kesembuhan, yang dibuktikan dengan tidak adanya *TGF -1* yang merupakan mediator kesembuhan luka.

**Kata kunci:** Stres, episiotomi, imunohistokimia, fibroblas dan *TGF -1*.

### ABSTRACT

This research was conducted to investigate the effect of stress on wound healing process. Twenty female *Sprague Dawley* rats, 3 months of age, 300 grams of body weight were used as experimental animals. Those animals were then divided into 2 groups of 10. Group I was used as control animal (stress negatif) and group II was group that made stress condition using ultrasonic sound machine (*vibra cell*) under frequency 6.6 kHz for 1 minute. All animals were then intramuscularly anaesthetized using 90 mg/kg of ketamine combined with 10 mg/kg of xylazine. Subsequently, episiotomy surgery was done by dorso lateral incision from skin to the mucosa of vulva. The wounds were then closed using cotton sutures size 000 with *simple interrupted method*. The distance from one to another suture was 30 mm. At 3 days after surgery, 10 rats (5 from group I and 5 from group II) were killed, the vulva tissue were taken out for histopathologic and *TGF -1* analysis. Therefore, the left of the animals sacrificed at 5 days post surgery and were used for analysis as mentioned above. The data analysis using 2x2 factorial method analysis of variance demonstrated that there were no significant differences in the fibroblast amount from group I and II ( $P > 0,05$ ). Conversely, the result of immunohistochemistry analysis using streptavidin-biotin method of vulva tissue of the rat showed that there were significant differences in the expression of *TGF -1* in vulva tissue of rat from group I and II. To conclude, stress is able to inhibit the wound healing process.

**Key words:** Stress, episiotomy, immunohistochemistry, Fibroblast, *TGF -1*

## PENDAHULUAN

Gangguan kesembuhan luka merupakan masalah yang selalu diperhatikan dalam setiap penanganan operasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi kesembuhan luka antara lain defisiensi protein, defisiensi vitamin A, defisiensi asam askorbat, defisiensi Zn, obesitas, faktor genetik, leukopenia, umur dan faktor hormonal sedapat mungkin dihilangkan agar kesembuhan luka dapat berlangsung sesuai dengan yang diharapkan (Archibald, 1974). Faktor hormonal yang terlibat dalam proses kesembuhan luka terutama adrenalin atau hormon kelenjar pituitaria yang terlibat pada masalah stres (Archibald, 1974). Pada manusia, kasus gangguan kesembuhan luka yang mengarah pada faktor hormonal sering terjadi pada wanita pasca melahirkan yang selalu dikaitkan dengan adanya tekanan kejiwaan (rasa takut) pada periode kehamilan hingga menjelang melahirkan. Pada hewan sendiri stres jarang diperhatikan, namun telah dibuktikan bahwa pemberian steroid dosis tinggi menyebabkan gangguan kesembuhan luka (Archibald, 1974).

Stres umumnya diartikan sebagai adanya rangsang yang bersifat mengganggu dan meningkatkan sekresi *Adreno Corticotropic Hormon* (ACTH) (Ganong, 1995). Menurut Goleman (1995), stress pada manusia dan hewan melibatkan hipokampus dan amigdala, suatu struktur yang terdapat pada bagian medial lobus temporalis otak. Adanya rangsang pada bagian tersebut akan menyebabkan thalamus mengeluarkan *Corticotropin Releasing Factor* (CRF). CRF selanjutnya akan menginduksi glandula pituitaria untuk mengeluarkan ACTH, suatu hormon steroid yang beredar ke dalam aliran darah. Di dalam darah, hormon steroid akan dibawa ke seluruh tubuh dan mempengaruhi kerja beberapa organ penting (Ganiswarna, 1995). Kesembuhan luka sendiri merupakan suatu fenomena yang kompleks, yang melibatkan sejumlah proses, termasuk induksi peradangan, regenerasi sel parenkim, migrasi dan proliferasi baik jaringan parenkim maupun jaringan konektifus, sintesis protein, serta pembentukan kembali jaringan konektifus sebagai komponen parenkim dan kolagenasi (Cotran, 1996). Secara histologis, proses perlambatan kesembuhan luka bisa terlihat dengan adanya gangguan fibroplasia dan kolagenasi pada hari ke 3 pasca kelukaan. Perlambatan proses fibroplasia dan kolagenasi sebenarnya dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain adalah berbagai faktor pertumbuhan seperti : *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) dan *Transforming Growth Factor* (TGF) -1 serta sitokin IL-1 dan IL-4 yang disekresi oleh leukosit dan fibroblas pada daerah luka yang menuju kesembuhan (Cotran dkk, 1996). *Growth Factor* tersebut sangat penting artinya pada proses kesembuhan luka.

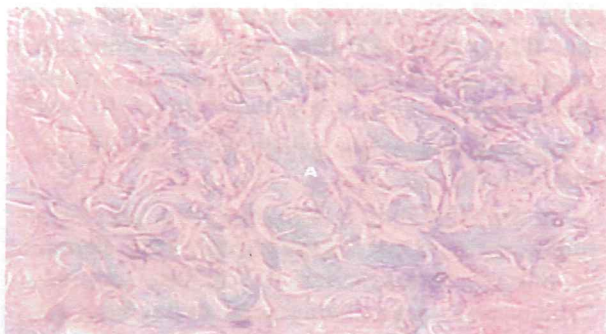
Beberapa growth faktor antara lain : TGF -1 , TGF -2 dan TGF -3, TGF  $\alpha$ , *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), PDGF AB dan PDGF BB, *Insulin-Like Growth Factor* (IGF) dan *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) telah dibuktikan terlibat pada proses kesembuhan luka (Singer dan Clark, 1999). TGF sendiri pada awalnya ditemukan sebagai kofaktor bersama-sama dengan TGF , memiliki kemampuan anti-proliferasi dan bekerja sebagai regulator negatif dari kekebalan dan hematopoiesis. Efek antiproliferasi TGF dapat timbul pada berbagai tipe sel, termasuk sel epitel, sel endotel, sel otot polos, sel hati fetus, sel myeloid progenitor awal dan limfosit baik T maupun B (Stites dan Terr, 1991). TGF juga dapat menghambat produksi antibodi poliklonal dependen dari sel T, menghambat induksi aktivitas sel *Natural Killer* (NK) dan menginduksi aktivasi sel *killer* oleh IL-2 (Stites dan Terr, 1991).

Peningkatan glukokortikoid pada kondisi individu stres akan menghambat respon peradangan, menghambat aktivitas fibroblas, menurunkan kebengkakan lokal dan menghambat efek sistemik toksin bakteri. Penurunan reaksi peradangan lokal disebabkan adanya hambatan pada fosfolipase A-2, sehingga pembentukan leukotrien, tromboksan, prostaglandin dan prostasiklin berkurang. Glukokortikoid juga memperlambat efek degradasi kolagen (Ganong, 1995). Selanjutnya Ganong (1995) juga mengatakan bahwa glukokortikoid akan menghambat pelepasan IL-1, meningkatkan, namun kemudian menurunkan kadar antibodi. Pada stres yang berat, jumlah ACTH yang disekresikan akan berlebihan, melebihi jumlah yang diperlukan untuk menghasilkan pengeluaran glukokortikoid yang maksimal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh stres terhadap proses kesembuhan luka operasi episiotomi pada tikus *Sprague Dawley*.

## MATERI DAN METODE

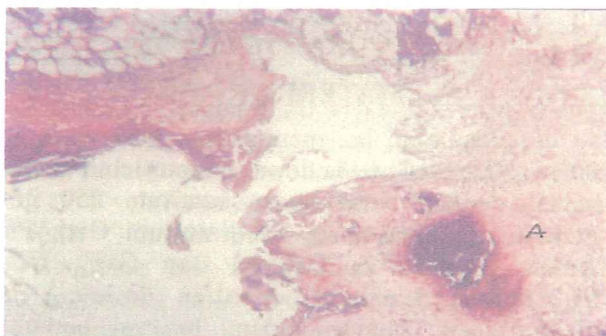
Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus *Sprague Dawley* betina dewasa, umur lebih kurang 3 bulan, dengan berat badan rata-rata 250 gram. Penelitian dilakukan di Laboratorium Gizi, Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta. Sebelum penelitian dimulai, tikus diadaptasikan dalam kandang tunggal percobaan selama 1 minggu dengan diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Tikus kemudian dibagi menjadi 2 kelompok secara acak, masing-masing 10 ekor tikus. Kelompok I adalah kelompok tikus kontrol, yaitu kelompok tikus yang dikandangkan dalam kondisi tenang (stress negatif), sedangkan kelompok II adalah kelompok tikus yang dibuat stress (stress positif), dengan memasukkan tikus-tikus tersebut satu demi satu ke dalam kotak pada mesin *vibra cell* (*Sound Abating Enclosure*)<sup>1)</sup>, dan diberi gangguan suara

denging dengan kekuatan suara 6,6 kHz, selama 1 menit. Segera setelah mengalami stress, semua tikus kemudian dibius dengan kombinasi ketamin<sup>2)</sup> dan Silazin<sup>3)</sup> (90 mg/kg BB ketamin dan 10 mg/kg BB Silazin) secara intra-muskuler. Bulu disekitar vulva dicukur, kemudian diolesi disinfektan iodium-tinctura untuk menciptakan suasana aseptis. Sayatan episiotomi dilakukan sepanjang 0,6 cm, arah dorso-lateral badan tikus dari kulit hingga tembus mukosa vulva (Waynforth dan Flecknell, 1998), kemudian dijahit kembali dengan benang katun steril 000, dengan model jahitan sederhana tunggal dengan jarak



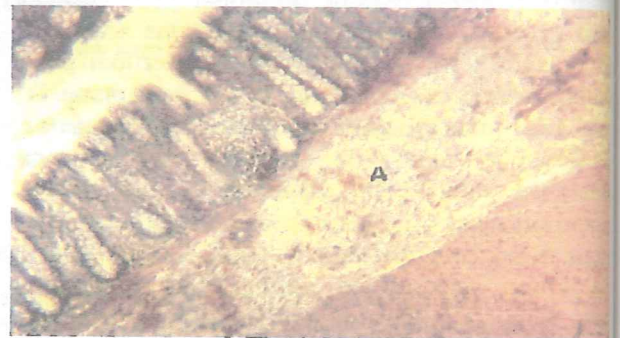
**Gambar 1.** Foto Mikrografi jaringan vulva normal. Fibroblas (A). (HE., Perbesaran : 400 x)

kira-kira 30 mm. Luka operasi salep antiseptika iodium, kemudian tikus diinjeksi dengan antibiotika Penisilin Oli<sup>4)</sup> dengan dosis 10.000 IU/kg BB juga secara intra-muskuler. Tikus kembali dikandangkan, kemudian pada hari ke 3 pasca operasi, tikus pada masing-masing kelompok diambil 5 ekor untuk dibunuh dan diambil jaringan vulva hasil operasi episiotomi, dimasukkan dalam *buffer* formalin 10 % untuk dibuat preparat histopatologis dengan

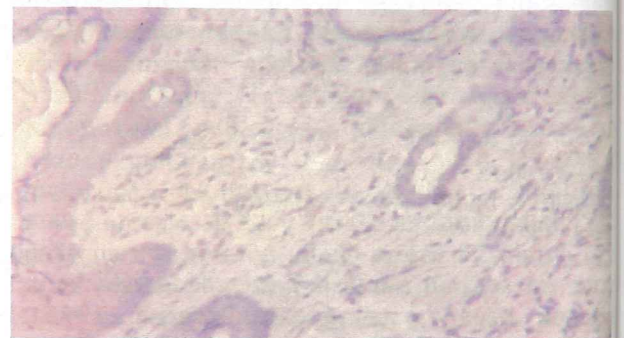


**Gambar 2.** Foto mikrografi jaringan vulva tikus kontrol menunjukkan positif TGF-1. TGF-1 (A) (Streptavidin biotin dengan antibodi anti TGF-1., Perbesaran: 100x)

pengecatan hematoksilin dan eosin (HE), serta preparat imunokimia untuk analisis TGF-1 dalam jaringan. Pengecatan preparat imunokimia dengan ki untuk analisis TGF-1<sup>5)</sup> dilakukan dengan cara sebagai berikut: Potongan jaringan yang sudah difiksasi dan masih mengandung paraffin, kemudian dideparafinasi dan rehidrasi, dicuci dengan PBS selama 10 menit, kemudian diinkubasikan dalam H<sub>2</sub>O,



**Gambar 3.** Foto mikrografi jaringan vulva tikus kontrol menunjukkan positif TGF-1. TGF-1 (A) (Streptavidin biotin dengan antibodi anti TGF-1 Perbesaran :200x)



**Gambar 4.** Foto mikrografi jaringan vulva tikus kelompok II menunjukkan negatif TGF-1. (Streptavidin biotin dengan antibodi anti TGF-1, Perbesaran :200x)

3% dalam methanol absolut selama 10 menit. Preparat kemudian dicuci kembali dengan PBS selama 10 menit, kemudian ditetesi *blocking solution*, untuk menghindari ikatan antibodi yang bersifat non spesifik. Cuci preparat dengan PBS selama 10 menit, kemudian ditetesi dengan konjugat streptavidin peroksidase selama 5 menit. Preparat dicuci kembali dengan PBS selama 10 menit, kemudian diberi substrat kromogen selama 5 menit pada temperatur kamar. Cuci preparat dengan akuades 10 menit, kemudian diberi *counterstain* hematoksilin selama 3 menit. Preparat dicuci bersih kemudian diberi larutan

1. Sonics & material, Inc, USA
- 2 & 3. Troy laboratory PTY Limited 98 Long Street NSW 2164, Australia
4. PT. Duta Kaisar Pharmacy, Solo-Indonesia
5. Santa Cruz Biotechnology 2161 Delaware Ave, California

Tabel I. Jumlah fibroblas tikus percobaan pada hari ke 3 dan ke 5 pasca Episiotomi (mean± Sd).

No	Stres Negatif		Stres Positif	
	Hari ke 3	Hari ke 5	Hari ke 3	Hari ke 5
1	15	30	6	10
2	8	30	10	20
3	20	12	20	10
4	15	35	8	10
5	17	24	10	23
? X	59	136	54	64
±Sd	11,8±5,7	27,2± 8,9	10,8 ±5,4	12,8 ±6,7

Tabel 2. Ekspresi *TGF β-1* pada potongan jaringan vulva selama percobaan pada hari ke 3 dan ke 5 pasca episiotomi, dianalisis secara deskriptif.

Hari	Stres negatif	Hasil	Stres positif	Hasil
	Nomor Tikus		Nomor Tikus	
3	4	++	12	-
	30	++	11	-
	21	+++	1	-
	18	+	22	-
	28	++	23	+
5	3	++	7	-
	15	+++	9	-
	13	+	14	+
	6	+	5	-
	8	+	10	-

*mounting media* dan ditutup dengan gelas penutup. Preparat histopatologi dengan pengecatan hematoksilin dan eosin diamati, dihitung jumlah fibroblasnya dengan metoda standar. Pengamatan jumlah fibroblas dilakukan dengan menghitung daerah sayatan pada 2 bidang pandang dengan perbesaran 200 x. dan di rata-rata. Analisis data dilakukan dengan statistika pola faktorial 2x2 dan diukur pada tingkat kesalahan 5 %. Analisis hasil preparat imunokimia dilakukan melalui pengamatan secara deskriptif dengan melihat munculnya perubahan warna coklat tua pada potongan jaringan dibawah mikroskop. Tikus sisanya kemudian juga diperlakukan sama dengan tikus sebelumnya pada hari ke 5 pasca operasi.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis statistik menggunakan analisis faktorial 2x2 menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan (tabel 1). Secara teoritis, kondisi stres hewan percobaan akan mengakibatkan peningkatan hormon glukokortikoid yang menyebabkan timbulnya hambatan pada respon peradangan, serta menghambat aktivitas fibroblas (Ganong, 1995). Jumlah fibroblas yang mendekati sama antara kelompok kontrol dan perlakuan diperkirakan disebabkan tingkat stres yang ditimbulkan oleh dending suara yang berasal dari

mesin *vibra cell* dengan kekuatan suara 6,6 kHz, dengan durasi 1 menit, belum meningkatkan kadar glukokortikoid secara maksimal. Kadar maksimal dari glukokortikoid dapat diperoleh jika stres tercapai secara maksimal. Disamping itu, durasi yang hanya 1 menit mungkin belum mencapai tingkat rangsang yang maksimal. Pada penelitian ini, faktor daya tahan terhadap rangsang dari tikus sangat memungkinkan mempengaruhi rendahnya efektifitas rangsang stres dengan *vibra cell*. Kemungkinan lainnya adalah adanya proses adaptasi yang menyebabkan tikus mampu bertahan dan menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Hal ini sangat berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, meskipun menggunakan tikus yang berasal dari galur yang sama. Hasil yang diperoleh dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kekuatan *vibra cell* 6,6 kHz dengan durasi 1 menit sudah cukup menyebabkan hewan mengalami eksitasi serta peningkatan kadar kortisol darah yang signifikan. Meskipun secara penghitungan jumlah fibroblas (Gambar 1), efek stres belum tampak menyebabkan gangguan kesembuhan luka, yang dibuktikan dengan perhitungan statistik jumlah fibroblas, namun, pada tingkat molekuler hasil analisis imunokimia metoda streptavidin-biotin pada potongan histopatologi jaringan vulva menunjukkan bahwa tikus dengan stres negatif (kontrol), menghasilkan angka positif pada *TGF-1* (Gambar 2 dan 3). Sebaliknya, jaringan vulva tikus



dari kelompok yang diinduksi stres ternyata negatif TGF-1 (Gambar 4). Keberadaan TGF-1 pada jaringan membuktikan bahwa proses kesembuhan luka berjalan secara baik. Stites dan Terr (1991), mengatakan bahwa TGF-1 adalah faktor pertumbuhan yang memiliki efek kemotaktik dan mitogenik pada fibroblas, meningkatkan kolagen, fibronektin dan sintesis kolagen, namun menghambat proliferasi sel endotel, sel epitel, sel otot polos, limfosit T dan B, hematopoietik stem sel, sel hepatosit fetus dan keratinosit; menghambat reaksi campuran dari leukosit generasi *cytotoxic T lymphocyte* (CTL) serta menekan perkembangan sel *natural killer* (NK) dan sel *Killer*. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa stres terbukti menyebabkan gangguan proses kesembuhan luka yang dibuktikan dengan tidak adanya TGF-1 dalam jaringan vulva tikus kelompok II

#### DAFTAR PUSTAKA

- Archibald, 1974, *Canine Surgery*. 2 ed. Ontario Veterinary College, Canada. 28-29
- Cotran, R.S., Kumar, V., and Robbins, S.L., 1996. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 5 ed. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 85-91
- Ganiswarna, S.G., 1995, *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. 482-484.
- Ganong, W.F., *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Penerbit EGC, Jakarta-Indonesia. 364-368.
- Goleman, D, 1995, *Emotional Intelligence*. Bantam Books, New York, Toronto, London.
- Singer, A.J dan Clarck, R.A.F., 1999. Cutaneous Wound Healing. *N.E.J.M*, Vol 341:738-746.
- Stites, D.P. dan Terr, A.I., 1991. *Basic and Clinical Immunology*. 7 ed, Prentice Hall International Inc, London, Sydney, Toronto, Mexico, New Delhi, Tokyo, Singapore, Rio De Janeiro, New Jersey. 98-99.
- Waynforth, H.B, dan Flecknell, P.A., 1998. *Experimental and Surgical Technique in The Rat*. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto