

POTENSI +DALETHYNE TERHADAP EPITELISASI LUKA PADA KULIT TIKUS YANG DIINFEKSI BAKTERI MRSA

William Sayogo*¹, Agung Dwi Wahyu Widodo², Yoes Prijatna Dachlan³

^{1,2,3} Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga; Kampus B. Jl. Airlangga No. 4-6, Surabaya
60286, Telp. (031) 5041566 / Fax. (031) 5029856

Program Studi S2 Imunologi, Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

e-mail: *sayogowilliam@gmail.com, ²agungmd.imun@yahoo.com

Abstrak

Proses penyembuhan luka merupakan bagian regenerasi jaringan kulit untuk memperbaiki kerusakan. Proses ini akan terhambat dengan adanya infeksi bakteri, terutama bakteri MRSA (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*) yang resisten terhadap antibiotik dan mampu membentuk lapisan biofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek topikal +dalethyne terhadap epitelisasi pada proses penyembuhan luka terinfeksi MRSA di kulit tikus wistar. Tiga puluh enam ekor tikus Wistar, berumur 3 bulan, dibagi dalam 6 kelompok, kontrol negatif (didekapitasi hari keempat dan hari keenam), kontrol positif (didekapitasi hari keempat dan keenam), perlakuan (didekapitasi hari keempat dan hari keenam). Perlukaan pada kulit punggung dengan cara diinsisi menggunakan pisau sepanjang 2 cm dan kedalaman sampai subkutan. Luka pada kontrol positif diinfeksi MRSA, kelompok perlakuan diinfeksi MRSA dan diaplikasikan +dalethyne. Setelah didekapitasi masing-masing kelompok pada hari ke-4 dan ke-6, jaringan kulit difiksasi dan dibuat preparat dan diberi pewarnaan Hemaktosilin Eosin. Panjang epitel diukur menggunakan Optilab yang dipasang pada mikroskop cahaya. Data panjang epitel dianalisis dengan membandingkan jumlah rerata dan SD. Panjang epitel pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol positif $\{(0,46 \pm 0,19) \text{ vs } (0,21 \pm 0,16); (0,63 \pm 0,76) \text{ vs } (0,42 \pm 0,301)\}$, sedang dibandingkan dengan kontrol negatif tidak jauh berbeda pada hari ke-4 dan ke-6 setelah perlakuan. Kesimpulan aplikasi topikal +dalethyne mempercepat epitelisasi pada proses penyembuhan luka kulit tikus yang terinfeksi MRSA.

Kata kunci: Penyembuhan luka, infeksi MRSA, +dalethyne, epitelisasi

Abstract

Wound healing is part of the regeneration of skin tissue from the damage. This will be hampered by the Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. This study aims to determine the effect of +dalethyne against epithelialization in wound healing of the skin MRSA-infected rats. Thirty six Wistar rats, 3 months old, are divided into 6 groups, 2 groups of negative control, 2 groups of positive control, 2 groups of treatment group (All are sacrificed on the fourth day and sixth day). Injury to the back skin of rats by a knife along the incised 2 cm and depth to subcutaneous. Wound of positive control groups infected by MRSA, wound in the treatment groups also infected MRSA and then applied topically +dalethyne. Each groups are sacrificed on day 4 and 6, the skin tissue is fixed, made histological preparations, stained with HE. The measurement of the epithelial length using Optilab mounted on a light microscope. The data are analyzed by comparing the mean and SD. The epithelial length in the treatment group was higher than the positive control $\{(0,46 \pm 0,19) \text{ vs } (0,21 \pm 0,16); (0,63 \pm 0,76) \text{ vs } (0,42 \pm 0,301)\}$, being compared with the negative control is not much different. Conclusion: Topical +dalethyne accelerates epithelialization in wound healing of the skin MRSA-infected rat.

Keywords: Wound healing, MRSA infection, +dalethyne, epithelialization

1. PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial sampai sekarang masih menjadi masalah serius terutama pada pasien yang harus menjalani perawatan di rumah sakit untuk jangka waktu yang lama. Beberapa bakteri penyebab infeksi nosokomial resisten terhadap satu atau beberapa antibiotik. Ini menyebabkan kondisi pasien yang rawat inap menjadi lebih buruk bahkan bisa menyebabkan kematian dan tentu saja biaya yang dikeluarkan pasien menjadi lebih besar. Tentu ini merugikan masyarakat pengguna pelayanan kesehatan seperti di rumah sakit. Salah satu indikator yang dipakai untuk menilai kinerja rumah sakit adalah infeksi nosokomial, yang merupakan indikator mutu pelayanan rumah sakit. Menurut keputusan menteri kesehatan (kepmenkes) tahun 2002 yang termasuk infeksi nosokomial adalah infeksi saluran kemih, infeksi luka operasi, pneumonia nosokomial, bakteremia nosokomial, infeksi flebitis serta infeksi lainnya. Kejadian infeksi nosokomial di RSUD Setjonegoro kabupaten Wonosobo menunjukkan peningkatan dari tahun 2010-2011 (0,37% menjadi 1,48% kasus). Prevalensi angka kejadian infeksi nosokomial di RSUD Setjonegoro pada semester II tahun 2009 (2,67), semester I dan II tahun 2010 (3,12 dan 4,36), serta semester I dan II tahun 2011 (9,68 dan 19,71) per 1000 pasien rawat inap (Nugraheni et al, 2012). Kasus infeksi nosokomial di Rumah Sakit Bhayangkara Surabaya terbanyak adalah flebitis karena tindakan pemasangan infus. Dari tanggal 1 sampai 31 Mei 2013, di ruang rawat inap Rumah Sakit Bhayangkara Surabaya ditemukan kejadian flebitis dari pasien yang telah dipasang infus terdapat 27 pasien yang mengalami flebitis dari 145 pasien yang terpasang infus atau sekitar 18,6%, yang sudah menampakkan adanya tanda-tanda flebitis seperti bengkak di sekitar tusukan jarum infus, kemerahan, dan nyeri sepanjang vena (Fitriyanti, 2015). Data terakhir dari Centers for Disease Control and Prevention menunjukkan 60% tempat pelayanan kesehatan di Amerika Serikat terjadi infeksi nosokomial yang disebabkan MRSA

(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). MRSA tipe CA-MRSA (*community acquired MRSA*) saat ini menjadi endemis pada beberapa rumah sakit di Amerika Serikat (Palavecino, 2014)

Infeksi oleh bakteri menghambat proses penyembuhan luka pada kulit pasien yang menjalani perawatan di rumah sakit, seperti pasien yang mendapat tindakan pembedahan, pemasangan protesis tulang, pemasangan kateter urin, pemasangan infus dalam waktu lama, luka gangren dan dekubitus pada pasien penyakit metabolik kronik dengan atau tanpa mengalami komplikasi atau pada pasien dengan defisiensi imun. Beberapa mikroba yang menyebabkan infeksi nosokomial pada kulit antara lain *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* Di penelitian ini dipilih bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai salah satu penyebab infeksi nosokomial pada kulit, dengan alasan bakteri ini biasanya merupakan bakteri yang sering ditemukan pada suatu keadaan infeksi yang berat atau kondisi pasien yang mengalami defisiensi imun atau infeksi gabungan dengan bakteri lainnya, bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi yang berat pada kulit (Tortora, 2016)

Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) termasuk bakteri yang mampu menghasilkan biofilm, toksin dan superantigen sehingga dapat menghindari sistem imun dalam tubuh dan juga mampu melindungi diri dari perusakan oleh antibiotik dengan transfer *staphylococcal cassette chromosome mec* (SSCmec) yang menghasilkan pelindung terhadap antibiotik yang mempunyai struktur *methicillin*. *Staphylococcus aureus* tipe ini bila menginfeksi pada kulit yang tidak utuh (seperti mengalami luka) akan memperberat tingkat kesakitan (Murray et al, 2016)

Luka pada kulit dapat terjadi oleh berbagai sebab antara lain luka karena trauma (mekanis, kimia, termal, elektrik) atau juga bisa dikarenakan penyumbatan pembuluh darah (seperti pada *Buerger disease*). Luka menyebabkan hilangnya struktur kulit bisa hanya terbatas pada epidermis atau bisa sampai dermis bahkan juga bisa sampai

mengenai otot. Bila luka sampai mengenai struktur dermis atau otot akan disertai perdarahan karena pembuluh darah juga terkena. Luka menjadi *port d'entry* bagi mikroorganisme untuk masuk ke dalam tubuh, menjadikan luka menjadi tidak steril. Mikroorganisme patogen yang masuk melalui kulit yang tidak intact dapat menyebabkan infeksi, dimana infeksi tersebut bisa bersifat lokal, menyebar sampai jaringan di bawah kulit bahkan dapat menyebar secara sistemik ke organ lain tergantung dari patogenitas dari mikroorganisme tersebut. Infeksi tersebut memicu respon imunitas tubuh untuk mengeradikasi kuman tersebut. Proses imun tersebut bisa bersifat non spesifik (*innate*) dan bisa juga sampai bersifat spesifik (*acquired*) (Abbas, 2015)

Ketika trauma terjadi dan merusak struktur kulit oleh berbagai sebab terjadilah peradangan atau inflamasi sebagai aksi pertahanan tubuh yang pertama dalam mempertahankan jaringan kulit agar tidak terjadi kerusakan yang meluas. Pada saat proses peradangan atau inflamasi tersebut berlangsung, terjadilah infiltrasi sel-sel radang seperti PMN (*polimorfonuclear*), makrofag dan limfosit yang bertujuan untuk menghancurkan jejas dan mikroorganisme patogen yang masuk ke daerah luka. PMN dan makrofag akan memfagosit kuman yang masuk melalui luka tersebut dan menghancurkan kuman tersebut dengan menghasilkan radikal bebas. Sedangkan limfosit diaktifkan melalui reseptor pengenalan patogen yang diekspresikan oleh sel dendritik. Limfosit yang teraktifasi akan menghasilkan sitokin pro inflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) (Modlin et al, 2008)

Epitelisasi merupakan salah satu mekanisme dasar penyembuhan luka. Tiga jaringan pokok yang berperan pada proses penyembuhan yaitu jaringan ikat, pembuluh darah dan epitel. Proses epitelisasi berlangsung kompleks yang melibatkan sel epitel berupa perubahan struktur internal sel epitel meliputi migrasi, proliferasi dan diferensiasi. Seringkali pada fase penyembuhan tersebut terjadi *overlapping* waktu, fisiologi dan tipe sel. Hal tersebut

tergantung pada etiologi penyebab luka, ada tidaknya infeksi, adanya obat atau tindakan yang mengintervensi (Han, 2016)

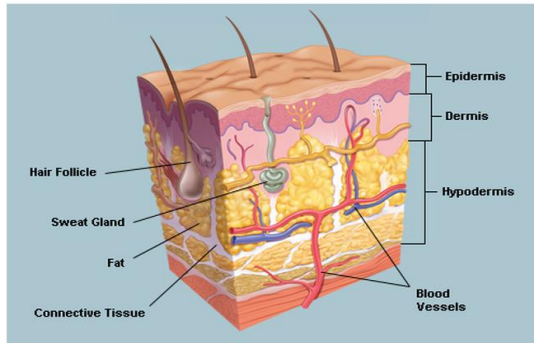
Adanya masalah resistensi bakteri terhadap banyak antibiotik, menyebabkan angka kematian dikarenakan infeksi MRSA semakin tinggi. Diperlukan obat lain yang juga mempunyai efektifitas untuk meeradikasi kuman yang resisten terhadap banyak antibiotik menjadi tantangan saat ini, dengan harapan angka kematian dikarenakan infeksi MRSA dapat ditekan. *+dalethyne* merupakan senyawa aktif baru yang diekstrak secara ozonisasi, terdiri dari kombinasi senyawa yaitu: minyak esensial (*aldehyde*), asam lemak (stearat, oleat, linoleat, palmitat), *iodine* dan peroksida. *+dalethyne* tersebut membentuk *antimicrobial agent* yang mampu membunuh bakteri juga mampu merangsang pembentukan jaringan baru pada kulit yang mengalami luka.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur dan Fungsi Kulit

Kulit merupakan organ tubuh terluas, berat total berkisar 2,7 – 3,6 kg dan menerima sepertiga dari volume darah tubuh, ketebalan kulit bervariasi antara 0,5 – 6,0 mm, terdiri dari sel – sel dan matriks ekstraselular. Struktur kulit terdiri dari 3 lapisan, epidermis merupakan lapisan terluar kulit dan tipis, dermis merupakan lapisan tebal dan terletak di dalam, lapisan di bawah dermis terdapat jaringan lemak subkutan (hipodermis). Jaringan hipodermis merupakan jaringan ikat longgar yang melekat di bawah dermis (Chu, 2008)

Kulit manusia mempunyai banyak fungsi yang penting terutama sebagai pertahanan garis depan, melindungi tubuh dari berbagai elemen yang berasal dari lingkungan luar tubuh. Jika terjadi luka pada kulit, integritas pertahanan kulit menjadi terganggu dan menjadi tempat masuk berbagai mikroorganisme seperti bakteri dan virus. Kulit juga dapat menjadi faktor penting dalam kesehatan mental dan kondisi sosial manusia (Han, 2016)



Gambar 1. Struktur kulit

Fungsi Epidermis sebagai pertahanan tubuh terluar terhadap lingkungan luar tubuh. Suasana asam pada kulit melindungi kulit dari mikroorganisme. Lapisan keratin yang keras melindungi tubuh dari invasi mikroorganisme dan infeksi juga menjaga kelembaban. Sel Langerhans membentuk reseptor pengenalan baik terhadap mikroorganisme, virus bahkan senyawa asing yang selanjutnya mengaktifkan sistem imunitas. Kemampuan tubuh mempertahankan kadar air penting untuk menjaga kesehatan kulit. Jumlah dan distribusi pigmen melanin yang memberikan keragaman warna pada kulit manusia. Vitamin D disintesis di epidermis dengan bantuan sinar ultraviolet, sintesis ini dilakukan oleh keratinosit yang terletak pada *stratum basale* dan *stratum spinosum* dari epidermis (Flanagan, 2013)

Dermis merupakan “rumah” dari komponen tambahan dari epidermis. Di dermis terdapat sel – sel imun yang berfungsi melawan infeksi yang masuk ke dalam kulit. Dermis menyediakan suplai darah, nutrisi dan oksigen pada dirinya sendiri dan juga epidermis. Dermis juga mempunyai fungsi pengaturan suhu kulit melalui pembuluh darah superfisial dan reseptor saraf berfungsi untuk sensasi rasa raba (Han, 2016)

Jaringan hipodermis atau subkutan merupakan lapisan yang terdiri dari lemak dan jaringan ikat yang kaya akan pembuluh darah dan saraf. Lapisan ini penting dalam pengaturan suhu kulit dan tubuh (Han, 2016)

2.2 Luka dan Proses Penyembuhan

Luka adalah suatu kondisi dimana adanya kerusakan pada struktur normal kulit dengan kedalaman dan tingkat berat ringan dari kondisi luka yang berbeda. Luka tidak hanya berbentuk goresan atau robekan pada lapisan kulit saja, tetapi bisa sampai jaringan di bawah kulit. Luka ada yang berbentuk luka terbuka, ada yang berbentuk luka tertutup. Luka terbuka misalnya luka insisi, laserasi, abrasi, luka tusuk, luka tembus. Luka tertutup berupa luka memar karena benda tumpul, lebam, luka dengan jaringan di bawah kulit rusak tetapi jaringan epidermis dan dermis masih utuh. Kedalaman luka beragam, kalau hanya terbatas pada epidermis disebut luka superfisial, bila meliputi sebagian lapisan dermis disebut luka *partial – thickness*. Luka *full – thickness* bila luka meliputi seluruh lapisan epidermis dan dermis bahkan bisa mengenai jaringan di bawah kulit seperti jaringan subkutan, fascia dan otot. Luka akut adalah luka yang proses penyembuhannya dapat diperkirakan waktunya antara 7 – 14 hari (Han, 2016)

Proses penyembuhan luka ada 4 fase yaitu: fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, fase *remodelling* atau penyusunan kembali struktur kulit. Pada gambar 2j tampak perkiraan waktu mulai serta lama dari masing-masing fase pada proses penyembuhan luka yang fungsional (tidak ada komplikasi atau infeksi) (Han, 2016)

2.2.1 Fase Hemostasis

Hemostasis terjadi segera setelah terjadi trauma, untuk menghentikan pendarahan dengan cara pembuluh darah yang terbuka mengalami vasokonstriksi dan platelet teraktifasi lalu saling menempel dan beragregasi di daerah luka. Platelet diaktifasi oleh kolagen ekstraselular (tipe I). Begitu platelet berinteraksi dengan kolagen, platelet akan melepaskan mediator (faktor pertumbuhan dan *cyclic AMP*) dan glikoprotein, yang memberi sinyal kepada platelet untuk menjadi lebih lengket dan berakumulasi. Granul alfa platelet melepaskan

glikoprotein berupa fibrinogen, fibronektin, thrombospondin dan faktor *von Willebrand*. Saat terjadi agregasi platelet, faktor pembekuan darah dilepaskan menyebabkan fibrin mengendap di daerah luka (Kumar et al, 2015)

2.2.2 Fase Inflamasi

Fase ini terjadi 24 jam setelah terjadi trauma pada kulit dan bisa berlangsung sampai 2 minggu tergantung apakah ada infeksi yang memperpanjang fase ini. Sel mast melepaskan granul yang berisi enzim, histamine dan amin aktif lainnya yang menimbulkan tanda-tanda inflamasi yaitu *rubor* (kemerahan), *calor* (panas), *tumor* (bengkak), *pain* (nyeri) di daerah sekeliling luka. Neutrofil, monosit dan makrofag merupakan sel-sel utama pada fase ini. Sel-sel ini berfungsi membersihkan infeksi pada luka dan debris dan melepaskan mediator-mediator terlarut seperti sitokin pro inflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-8), dan faktor pertumbuhan (seperti PDGF, TGF- β , TGF- α , IGF-1 dan FGF) yang terlibat dalam pengerahan dan pengaktifan fibroblast dan sel epitel untuk persiapan fase berikutnya dari proses penyembuhan luka (Koh et al, 2013)

2.2.3 Fase Proliferasi

Fibroblas bermigrasi ke luka sebagai respon terhadap mediator-mediator larut yang dilepaskan platelet dan makrofag. Migrasi dari fibroblas menuju ke matriks ekstraselular sangat bergantung pada pengenalan dan interaksi fibroblast dengan komponen-komponen spesifik dari matriks. Pada kondisi dermis normal fibroblas tidak aktif dan tidak terdistribusi, namun pada matriks di area luka dan pada jaringan granulasi, fibroblas menjadi aktif dan bertambah banyak. Fibroblas berikatan dengan komponen-komponen matriks seperti fibronektin, vitronektin, dan fibrin melalui reseptor integrin dari

fibroblas. Reseptor integrin melekat pada rangkaian asam amino spesifik (R-G-D atau asam arginin-glisin-aspartat) atau pada sisi ikatan dari komponen matriks. Ketika salah satu sisi fibroblas berikatan dengan komponen matriks, sel memperluas tonjolan

sitoplasmanya untuk mencari sisi ikatan lainnya. Begitu menemukan sisi ikatan baru, sisi ikatan sebelumnya dilepaskan (oleh aktifitas protease lokal) dan sel menggunakan jaringan sitoskeleton serabut aktin untuk bergerak maju. Fibroblas mensekresikan enzim proteolitik untuk memfasilitasi pergerakan fibroblas menuju matriks. Enzim yang disekresikan meliputi tiga jenis MMP antara lain kolagenase (MMP-1), gelatinase (MMP-2 dan MMP-9) yang menghancurkan senyawa gelatin, stromelisin (MMP-3) yang mempunyai beberapa senyawa protein pada ECM (*extracellular matrix*) (Han, 2016)

2.2.4 Fase Remodelling

Remodeling merupakan fase terakhir dari proses penyembuhan luka yang terjadi setelah jaringan granulasi menjadi jaringan parut dan kekuatan elastisitas kulit meningkat. Pematangan jaringan granulasi melibatkan pengurangan jumlah kapiler dengan cara menyatu dengan pembuluh darah besar dan penurunan kadar *glycosaminoglycan* (GAG), air yang terikat pada GAG dan *proteoglycan*. Kepadatan sel dan aktifitas metabolisme menurun pada jaringan granulasi yang mengalami pematangan. Perubahan juga terjadi pada tipe, jumlah dan penyusunan kolagen, yang memperkuat elastisitas. Pada awalnya kolagen tipe III disintesis dalam jumlah banyak, selanjutnya digantikan kolagen tipe I, didominasi kolagen saraf di kulit. Kekuatan elastisitas epitel baru pada luka hanya 25% dibandingkan jaringan normal. Perbaikan jaringan kulit yang mengalami luka tidak akan pernah sekuat jaringan kulit normal yang tidak pernah mengalami luka (Han, 2016)

2.3 Epitelisasi

Proses epitelisasi merupakan proses yang meliputi perlekatan sel epitel dan terjadi perubahan struktur epitel selanjutnya bermigrasi, berproliferasi dan berdiferensiasi. Jaringan epidermis yang dewasa dan utuh terdiri dari lima lapisan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, sel-sel epitelnya

berdiferensiasi dimulai dari keratinosit pada stratum basalis epidermis berbatasan dengan dermis yang berbentuk kuboid. Hanya sel-sel epitel stratum basalis yang mampu berproliferasi, selanjutnya melekat baik dengan sel-sel sekitar dan membran basalis melalui bantuan penghubung interselular yaitu *desmosome* (untuk perlekatan antar sel) dan *hemidesmosomes* (untuk perlekatan epitel dengan membran basalis). Faktor-faktor pertumbuhan (EGF, *keratinocyte growth factor* / KGF, TGF- α) yang dilepaskan berikatan dengan reseptor masing-masing faktor pertumbuhan pada sel epitel dan memicu terjadinya migrasi dan proliferasi. Ikatan faktor pertumbuhan dengan reseptor memicu *desmosome* dan *hemidesmosome* larut sehingga sel dapat bermigrasi. Reseptor integrin tereksresi dan sel epitel basalis yang berbentuk kuboid berubah menjadi pipih dan bermigrasi membentuk lapisan tipis diatas jaringan granulasi baru, mengikuti panjang dari serabut kolagen (Li et al, 2005)

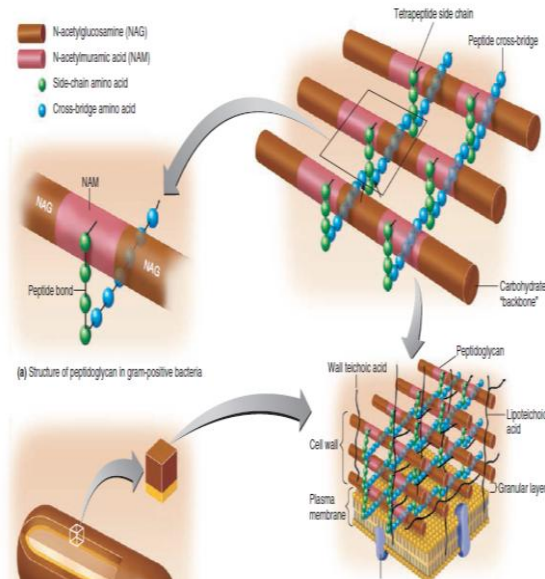
Proliferasi sel epitel basalis pada daerah sekitar luka menyediakan sel baru pada lapisan sel epitel diatas jaringan granulasi. Sel-sel epitel pada lapisan tersebut membentuk dan mensekresikan enzim proteolitik (MMP) yang memungkinkan sel berpenetrasi ke *scar*, permukaan nekrosis, atau *eschar*. Peranan MMP membentuk kembali ECM, migrasi sel, aktifasi faktor mitogenik. Migrasi sel terus berlanjut sampai sel epitel bertemu dengan sel tambahan lainnya membentuk lapisan yang menyatu. Begitu pertemuan terjadi, seluruh lapisan epitel dalam keadaan berproliferasi dan lapisan epidermis yang berlapis-lapis terbentuk dan matang untuk memperbaiki fungsi pertahanan kulit. TGF- β merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang mempercepat pematangan (perubahan dan keratinisasi) lapisan epidermis. *Desmosome* dan *hemidesmosome* interselular menempel pada membran basalis yang baru. Epitelisasi menjadi penanda klinis dari penyembuhan luka tetapi bukan akhir proses penyembuhan (Han, 2016)

2.4 *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

2.4.1 Morfologi *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus* merupakan organisme bersel tunggal yang disebut *prokaryotes*. Bakteri ini berbentuk kokus (bulat) yang berkelompok (gambar 2d), struktur sitoplasmanya terdapat inti yang disebut *nukleoid*, kromosom dari bakteri ini merupakan DNA berserat ganda, ekstra kromosomal dan tidak ada nukleosom (plasmid), ribosom 70s dan tersusun dari subunit 30s dan 50s. Membran sitoplasma mempunyai struktur lemak (kolesterol) dua lapis. Bakteri ini mempunyai kapsul yang tersusun dari polisakarida, *pili* yang berfungsi untuk perlekatan, *fimbriae* dan *flagella* yang berfungsi untuk pergerakan dari bakteri (Murray et al, 2016)

Dinding sel bakteri merupakan suatu kompleks, strukturnya kurang elastis, dan mempengaruhi bentuk sel. Fungsi utama dinding sel untuk melindungi sel bakteri dari perbedaan tekanan intraselular yang lebih besar dari ekstraselular yang berisiko sel tersebut akan ruptur (pecah). Secara klinis dinding sel penting karena berkontribusi pada kemampuan bakteri untuk menyebabkan penyakit, bagian perlekatan dengan reseptor APC (*antigen presenting cell*), juga menjadi tempat kerja dari antibiotik. Dinding sel bakteri *S. aureus* terdiri dari makromolekul *peptidoglycan*, *teichoic acid* dan *lipoteichoic acid* (Tortora et al, 2016)



Gambar 2. Struktur dinding sel *S.aureus*

2.4.2 Patogenesis *Staphylococcus aureus*

Dua faktor penentu yang diduga sebagai faktor virulensi bakteri *S. aureus* yaitu gen *ica* yang menyandi pembentukan *poly-N-acetylglucosamine/polysaccharide intercellular adhesion* (PNAG / PIA) serta penyisipan gen IS256. IS256 berperan dalam adaptasi genetik pada saat infeksi, dengan cara menyisip pada lokus *ica* atau pada *agr*. Penyisipan pada *ica* akan meningkatkan pembentukan PNAG / PIA, sedang penyisipan pada *agr* akan menghambat fungsi regulasi pembentukan biofilm sehingga biofilm terbentuk semakin tebal. Kedua faktor virulensi ini membantu *S. aureus* untuk berkolonisasi baik yang komensal maupun yang menimbulkan infeksi (Sunhyo et al, 2014)

Peranan PNAG / PIA, PGA, dan *protease* ScpA melindungi bakteri terhadap protein anti mikroba yang dihasilkan pertahanan tubuh non spesifik (*innate*). Perlekatan interselular oleh PIA dan protein biofilm merupakan hal yang penting bagi bakteri terhadap stress mekanis pada lingkungan kulit. PGA berperan pada toleransi osmotik yang merupakan fungsi asli dari polimer ini pada *S. aureus* non infeksius. Perbedaan antara molekul protein permukaan *surface components recognizing adhesive*

matrix molecules (MSCRAMMs) antara galur yang komensal dengan yang infeksius masih belum ada data yang jelas dan pasti. Karena faktor virulensi ini *S. aureus* secara klinis dapat menyebabkan infeksi kulit bergantung pada frekuensi kontaminasi oleh bakteri, mekanisme bakteri untuk melekat pada kulit manusia dan kemampuan bakteri menghindari sistem imun yang membantu bakteri untuk berkolonisasi dan bila dalam jumlah besar populasi bakteri tersebut dapat menimbulkan infeksi (Murray et al, 2016)

S. aureus menghasilkan beberapa toksin yaitu eksotoksin (5 toksin sitolitik, 2 toksin eksfoliatif, enterotoksin dan *toxin shock syndrome toxin-1/TSST-1*) dan endotoksin. Toksin eksfoliatif A, enterotoksin dan TSST-1 termasuk kelas polipeptida yang disebut superantigen (Murray et al, 2016)

Methicillin-resistant S. aureus mempunyai gen yang berperan dalam resisten antibiotik tertentu terutama resisten terhadap *methicillin* yang sering menjadi pilihan pertama antibiotik untuk infeksi stafilocokus. Gen yang menyandi resisten terhadap *methicillin* pada *mobile genetic elements* (MGEs) diberi nama *staphylococcal cassette chromosome mec* (*SCCmec*), yang mengandung gen *mecA* yang menyandi protein yang berikatan dengan *penicillin / β lactam*, PBP2a (*penicillin-binding protein 2a*). PBP2a merupakan enzim pada membran bakteri yang mengkatalisa reaksi transpeptidasi yang penting untuk ikatan silang pada rantai peptidoglikan. Oleh karena PBP2a mempunyai afinitas yang rendah untuk semua antibiotik β -*lactam*, membuat stafilocokus mampu bertahan pada paparan dosis tinggi dari antibiotik golongan ini. Pada *S. aureus* ada 10 struktur *SCCmec* yang sudah teridentifikasi salah satunya *SCCmec* tipe IV. Pada *S. aureus* yang resisten *metichillin* ternyata juga ditemukan resisten terhadap antibiotik lain seperti *rifampicin*, *flouroquinolone*, *gentamisin*, *tetracycline*, *chloramphenicol*, *erythromycin*, *clindamycin* dan *sulfonamide* (Ito et al, 2014)

2.5 Sistem Imun Kulit terhadap Infeksi MRSA

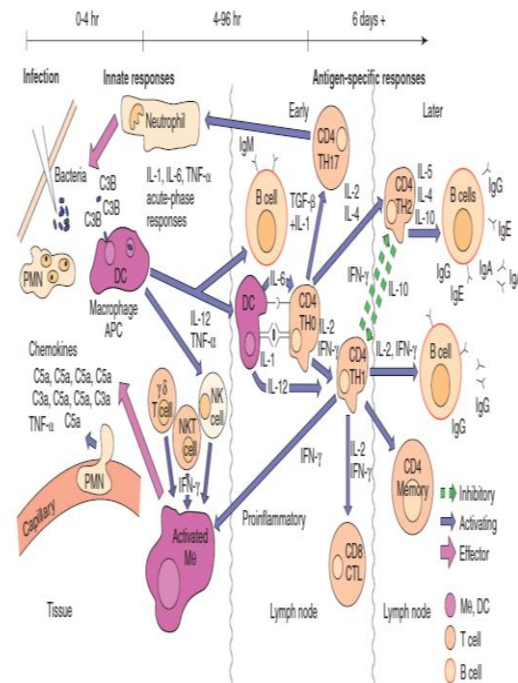
2.5.1 Sistem Imun Non Spesifik

Infeksi dimulai ketika patogen berhasil menembus pembatas anatomis dari inang. Beberapa mekanisme sistem imun non spesifik mulai diaktifkan meliputi beberapa kelompok molekul terlarut baik yang ada di cairan ekstraselular, darah, dan yang disekresikan sel epitel. Molekul terlarut antara lain enzim antimikroba seperti *lysozyme* untuk mencerna dinding sel bakteri; peptida antimikroba seperti *defensin* untuk melisis membran sel bakteri; sistem protein plasma yang dikenal sebagai sistem komplemen untuk melisis sel bakteri. Fagositosis dalam sistem imun non spesifik oleh sel seperti neutrofil dan makrofag. Bila fagositosis gagal membunuh bakteri, sel imun non spesifik diaktifkan oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) yang mengenali molekul yang disebut *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang merupakan ciri khas dari mikroba. Sel-sel pada sistem imun non spesifik yang teraktifasi melibatkan berbagai mekanisme efektor untuk menghilangkan infeksi. Bila infeksi masih mampu menembus pertahanan non spesifik maka mekanisme pertahanan melibatkan respon imun spesifik yang akan menghancurkan patogen secara spesifik dan membentuk sel-sel memori jangka panjang (Murphy, 2017)

2.5.2 Sistem Imun Spesifik

APC (*antigen presenting cell*) yang diinduksi oleh fagositosis *S. aureus* dan stimulasi TLR oleh komponen dinding sel *S. aureus* mengekspresikan MHC kelas II. MHC kelas II akan berikatan dengan TCR (*T cell receptor*) CD4⁺. Sel T helper (sel Th) CD4⁺ berdiferensiasi menjadi Th17 yang menghasilkan sitokin IL-17 dan IL-22. Sitokin IL-17 menstimulasi kemokin, sitokin lainnya (IL-1, IL-6, TNF, CSF/*colony stimulating factor*) yang meningkatkan produksi dan merekrut neutrofil selain itu juga menstimulasi produksi peptida anti mikroba (AMP). Sedang IL-22 berfungsi meningkatkan fungsi barrier

dan menstimulasi produksi AMP. Sel APC juga menghasilkan sitokin IL-1 dan IL-6 yang bergabung dengan faktor pertumbuhan TGF- β (transforming growth factor- β) mengaktifkan faktor transkripsi STAT3 dan ROR γ T yang menstimulasi diferensiasi dari sel T CD4⁺ menjadi Th17. Pada gambar 3 tampak adanya kolaborasi antara sistem imun non spesifik dan spesifik terhadap infeksi bakteri pada kulit (Ranzato, 2011)



Gambar 3. Respon imun terhadap infeksi MRSA pada luka di kulit

2.6 Komponen Senyawa *+dalethyne* dan Fungsi Dalam Proses Penyembuhan Luka yang Terinfeksi Bakteri MRSA

+dalethyne senyawa yang berasal dari *olive oil* yang diozonisasi, pertama diperkenalkan di India pada tahun 2015 oleh suatu perusahaan yang bergerak di bidang pembuatan produk perawatan kulit berbasis dari tanaman. Proses ozonisasi melalui sistem injeksi ozon dengan menggunakan generator ozon plasma dingin (Edward, 2009)

Hasil pengujian yang dilakukan Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga diperoleh penyusun senyawa *+dalethyne* yaitu asam lemak (asam

lemak oleat, asam lemak palmitat, asam lemak stearat, asam lemak linoleat), minyak esensial (golongan *aldehyde*), iodine dan peroksida.

Fungsi dari asam lemak tidak jenuh (*unsaturated*) mempunyai aktifitas anti bakteri yang sangat baik terhadap bakteri MRSA. Asam lemak tidak jenuh menghambat aktifitas enzim dalam sel bakteri, menghambat pengambilan nutrisi oleh bakteri, pembentukan peroksidasi dan auto oksidasi yang langsung berefek melisis sel bakteri.

Minyak esensial mempunyai aktifitas anti bakteri juga. Mekanismenya yaitu berefek pada dinding sel dan struktur membran bakteri, perubahan homeostasis pH di dalam sel bakteri, ekspresi *chaperone* dan protein permukaan sel yang berlebihan. Minyak esensial meningkatkan permeabilitas dari sel bakteri yang mengakibatkan hilangnya bahan penting dalam sel (berakibat trauma pada struktur sel). Minyak esensial menyebabkan influk proton yang menyebabkan kadar proton melebihi kapasitas penyangga sitoplasma, penurunan pH, gangguan pada fungsi penting sel. Minyak esensial menyebabkan juga ekspresi berlebihan protein *chaperone* (DnaK, GroEL, HtpG dan Trigger factor Tf) dan protein permukaan sel (OmpX dan OmpA) yang mengganggu jalur metabolik sel bakteri. Minyak esensial sangat efektif untuk menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri MRSA melalui mekanisme *quorum sensing* yang menghambat pembentukan dan sekresi molekul sinyal yang penting dalam pembentukan biofilm. Pada bakteri MRSA yang resisten banyak obat, ternyata masih sensitif dengan minyak esensial (Faleiro et al, 2014)

Iodine dan peroksida merupakan antiseptik topikal yang mempunyai efek membunuh, menghambat atau mengurangi jumlah bakteri pada luka. Antiseptik ini mempunyai aktifitas antimikroba spektrum luas (Atiyeh, et al, 2009)

3. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental murni pada laboratorium (*True Experimental*) karena penelitian ini diberikan

intervensi dengan semua variabel luar yang mempengaruhi dikendalikan, penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Obyek Penelitian adalah tikus *Rattus norvegicus* strain *Wistar* berumur sekitar 3 bulan dengan berat badan 200-250 gram. Kelompok obyek penelitian ada 6 kelompok yaitu O1 (kontrol negatif diamati sampai hari ke-4), O2 (kontrol negatif diamati sampai hari ke-6), OK1 (kontrol positif diamati sampai hari ke-4), OK2 (kontrol positif diamati sampai hari ke-6), OP1 (kelompok perlakuan diamati sampai hari ke-4), OP2 (kelompok perlakuan diamati sampai hari ke-6). Kontrol negatif adalah luka tikus tanpa diinfeksi MRSA, kontrol positif adalah luka tikus diinfeksi MRSA, perlakuan adalah luka tikus diinfeksi MRSA dan dioles *+dalethyne*. Tiap kelompok berisi 6 ekor tikus (total 36 ekor tikus), tiap 6 ekor tikus diberi penomoran 1 sampai 6 dengan kertas yang lekatkan pada ekor, selanjutnya tiap tikus dirandom dimasukkan ke 6 kelompok sampai tiap kelompok terdapat 6 ekor tikus.

Setiap tikus ditimbang dan dimasukkan ke dalam kandang berukuran 20 x 15 x 15 cm untuk adaptasi. Tikus di anestesi menggunakan larutan ketamin. Pembuatan larutan ketamin yaitu 3 ml ketamin ditambah 1 ml *xylazine* diencerkan menggunakan *aquabidest* untuk injeksi 6 ml, lalu diinjeksi pada tikus (0,1 ml per tikus) hingga tikus sudah dalam keadaan tenang dan hanya terlihat pernafasan perut. Setelah tikus dalam keadaan teranestesi dicukur dengan luas bidang 3 cm x 3 cm, didesinfeksi dengan betadin selanjutnya dilakukan sayatan pada kulit punggung tikus dengan pisau skapel dengan panjang luka ± 2 cm dengan kedalaman sampai lapisan subkutan.

Pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan, luka pada kulit tikus diinfeksi bakteri MRSA dengan kadar 50 mikro liter dari suspensi kuman 0,5 mcFarland dengan cara dioles menggunakan *micropipet* pada luka. Pemberian bakteri dilakukan setelah luka berhenti pendarahan. Pemberian krim yang mengandung senyawa aktif *+dalethyne* pada daerah luka pada kelompok perlakuan. Aplikasi krim yang mengandung

senyawa aktif *+dalethyne* menggunakan *cotton bud* dilakukan 2 hari setelah terjadi infeksi. Aplikasi atau pengolesan dilakukan tiap hari. Pada hari ke-4 dan ke-6 setelah perlakuan, setiap kelompok termasuk kelompok kontrol negatif dikorbankan dengan menggunakan ketamin sebagai anestesinya. Kemudian kulit dipotong dengan cakupan kulit normal 0,5-1 cm dari tepi luka selanjutnya dimasukkan kedalam larutan fiksasi buffer formalin 10% selama 15-24 jam dan selanjutnya tikus yang telah mati dikubur.

Potongan jaringan kulit selanjutnya dibuat preparat dan dilakukan pengecatan HE. Setelah itu diamati dan diukur panjang epitel dengan Optilab yang dipasang pada lensa okuler mikroskop dengan pembesaran 40x.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

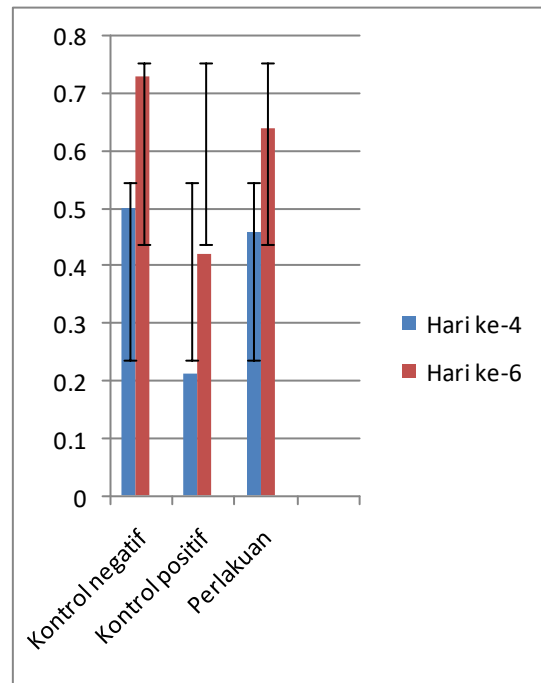
4.1 Hasil Penelitian

Rerata dan simpangan baku (SD) panjang epitel pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan ditunjukkan pada tabel 1, menunjukkan peningkatan panjang epitel pada kelompok perlakuan baik pada hari ke-4 dan hari ke-6 dibandingkan kelompok kontrol positif.

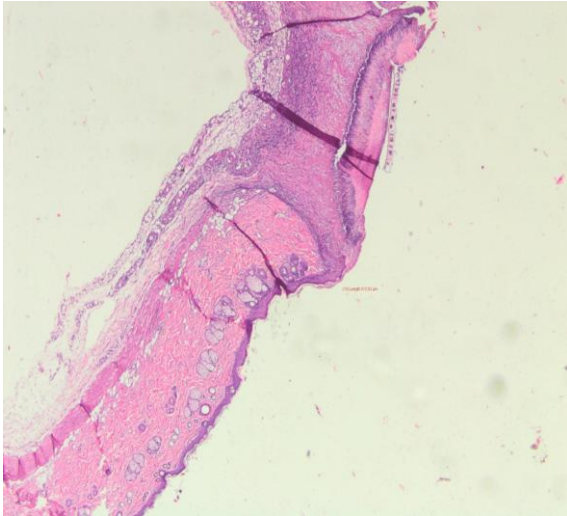
Kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol negatif memperlihatkan tidak jauh perbedaan panjang epitelnya baik pada hari ke-4 maupun hari ke-6.

Tabel 1 Rerata dan standar deviasi panjang epitel (konversi dari μm ke mm) pada kulit tikus Wistar yang luka pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan

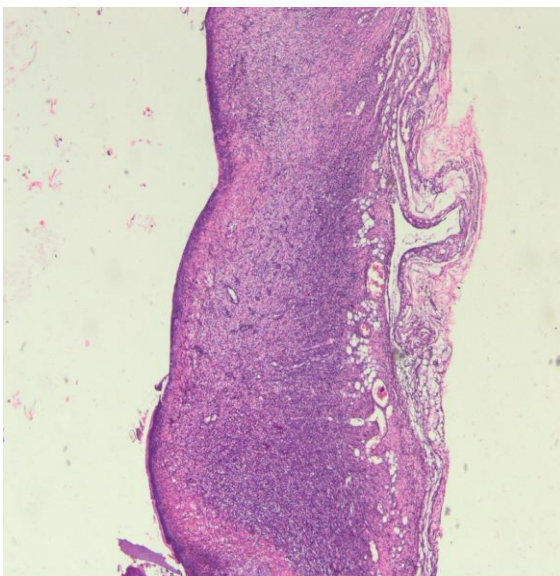
| Kelompok | | Hari ke-4 | Hari ke-6 |
|------------------|------|-----------|-----------|
| Kontrol negative | Mean | 0,59 | 0,73 |
| | SD | 0,711505 | 0,0083666 |
| Kontrol Positif | Mean | 0,21333 | 0,42 |
| | SD | 0,162682 | 0,301993 |
| Perlakuan | Mean | 0,46 | 0,638333 |
| | SD | 0,194422 | 0,761326 |



Gambar 4 Distribusi dan rerata panjang epitel masing-masing kelompok



Gambar 4. Gambaran mikroskopis jaringan epitel pada hari ke-4 setelah perlukaan pada kelompok kontrol negatif (pembesaran 40x)



Gambar 5. Gambaran mikroskopis menunjukkan tidak adanya proses pembentukan epitel pada hari ke-6 setelah perlukaan pada kelompok kontrol positif (pembesaran 40x)

4.2 Pembahasan

Pada penelitian ini, hasil rerata panjang epitel kulit tikus Wistar baik pada kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan menunjukkan peningkatan dari hari keempat dan keenam. Hal ini menandakan adanya

proses epitelisasi telah terjadi pada ketiga kelompok. Keadaan ini sesuai dengan teori proses penyembuhan luka, yaitu proses epitelisasi dimulai pada hari ke-3, lapisan epitel menutupi dasar luka. Pada kelompok control negative dan perlakuan sudah terdapat keratin, sedang pada kelompok control positif belum tampak. Pada 24 jam setelah perlukaan, keratinosit bermigrasi ke lateral dan meregenerasi membrane basalis. Setelah membrane basalis baru terbentuk, keratinosit berhenti bermigrasi selanjutnya berproliferasi sampai puncaknya pada hari ke-4.

Lapisan epitel terus memanjang dan menebal, selanjutnya jaringan epitel baru yang terbentuk mengalami pematangan dan tampak lapisan korneum baru. Dengan adanya regenerasi dari membran basalis, keratinosit kembali ke bentuk awalnya dan terjadi perlekatan kembali hemidesmosom terhadap lamina basalis. Adanya *retepeg* menunjukkan proses epitelisasi sedang berjalan untuk membentuk jaringan epitel yang normal kembali. Sel-sel epitel yang telah bermigrasi akan saling berhubungan dan menutup permukaan luka. Setelah mencapai ketebalan epitel yang normal, migrasi sel-sel epitel berhenti..

Pada kelompok kontrol positif menunjukkan rerata panjang epitel paling rendah. Hal ini disebabkan memanjangnya proses inflamasi akibat infeksi MRSA. Fibroblas masih aktif membentuk kompleks *inflammasome* menghasilkan sitokin pro inflamasi IL-1 β . Fibroblas juga berproliferasi dan berdiferensiasi mensintesis komponen jaringan granulasi (kolagen, elastin, dan proteoglikan).

Pada kelompok perlakuan, rerata panjang epitel hampir menyamai kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan *+daletyhne* mampu membunuh bakteri MRSA dan memicu epitelisasi sehingga waktu penyembuhan luka menyamai waktu penyembuhan luka secara fisiologis. Komponen asam lemak tidak jenuh, minyak esensial, *iodine* dan peroksidase mampu membunuh bakteri MRSA yang resisten terhadap antibiotik. Minyak esensial juga menurunkan pH lingkungan mikro luka yang

memicu migrasi dan proliferasi dari keratinosit. Dengan pematangan jaringan epitel baru yang terbentuk, sel-sel epitel bermigrasi ke tepi luka lalu berproliferasi sampai saling berhubungan dan menutup luka.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian ini, diperoleh kesimpulan aplikasi topical **+dalethyne** berpengaruh dalam mempercepat epitelisasi proses penyembuhan luka pada kulit tikus Wistar yang terinfeksi bakteri MRSA.

5.2 Saran

Penelitian ini diharapkan menjadi dasar untuk penelitian berikutnya dengan aplikasi kepada manusia, untuk melihat apakah **+dalethyne** juga efektif meningkatkan epitelisasi pada luka manusia terutama luka infeksi seperti luka gangren, luka dekubitus, sehingga **+dalethyne** bisa menjadi obat alternatif bagi luka infeksi oleh bakteri yang resisten berbagai antibiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, AK. Andrew, H. and Pillai, S. 2015. *Cellular and Molecular Immunology 8th Edition*. Philadelphia; WB Elsevier Company: Pp 35-168, 339-350, 493-500
- Aller, M.A. Arias, J.I. et al. 2011. *Oxygen-Related Inflammatory Wound Process, Phases, and Promoting*, Jane E. Middleton (ed.). New York: Nova Science Publishers Inc. Pp. 25-48
- Atiyeh, Bishara S. Dibo, Saad A. Hayeh, Shady N. 2009. Wound Cleansing, Topical Antiseptics and Wound Healing. *International Wound Journal*, Vol 6, No. 6: 420-438
- Brittany, Busse. 2016. Wound Management in Urgent Care. *Springer International Publishing Switzerland*: 1-55
- Bergsson, Gudmundur. Hilmarsson, Hilmar. Thormar, Halldor. 2011. *Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activities of Lipids in Lipids and Essential Oil as Antimicrobial Agents* (Halldor Thormar ed). USA: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 48-75
- Badiu, Diana. Vasile, Monica. Teren, Ovidiu. 2011. *Regulation of Wound Healing by Growth Factor and Cytokines in Wound Healing: Process, Phases, and Promoting*, Jane E. Middleton (ed.). New York: Nova Science Publishers Inc. Pp. 73-93
- Bergstresser, Paul R. 2008. *Basic Science Approaches to the Pathophysiology of Skin Disease in the Skin in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 87-92
- Berger, Timothy G. 2008. *General Considerations of Bacterial Diseases in the Skin in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 1689-93
- Cassat, James E. Smeltzer, Mark S. and Lee, Chia Y. 2014. Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocol, Methods in Molecular Biology second edition*. Springer Science+Business Media, LLC. Vol. 1085. Pp. 195-200
- Cordeiro, J.V. Jacinto, A. 2013. The Role of Transcription-Independent Damage Signals in the Initiation of Epithelial Wound Healing. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, Volume 14: Pp. 249-262
- Choi, Jin Kyui. Jang, Ji-Hye. Jang, Won-Hee. Kim, Jaekwan. Bae, Il-Hong. Bae, Joonho. Park, Young-Ho. Kim, Beum Joon. Lim, Kyung-Min. and Park, Jin Woo. 2012. The Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) Conjugated With Low-Molecular-Weight Protamine (LMWP) On Wound Healing of The Skin. *Biomaterial Elsevier Ltd*; 33(33): 8579-90.

- Carson, Christine F. Hammer, Katherine A. 2011. *Chemistry and Bioactivity of Essential Oil in Lipids and Essential Oil as Antimicrobial Agents (Halldor Thormar ed)*. USA: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 204-223
- Chu, David H. 2008. *Development and Structure of Skin in the Skin in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 57-72
- Chin, G.A. Diegelmann, R.F. and Schultz, G.S. 2005. *Cellular and Molecular regulation of Wound Healing. In (Falabella AF, Krisner RS, eds). Wound Healing*. New York: Taylor&Francis Group, pp.17-29
- De Masi, Elen C.D.J. Campos, Antonio C. L. De Masi, Flavia D.J. Ratti, Marco A.S. Ike, Isabela S. and De Masi, Roberta D.J. 2015. The Influence of Growth Factors on Skin Wound Healing in Rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 293 (www.bjorl.org): 1-10
- Di Ciccio, P. Vergara, A. Festino, A.R. Paludi, D. Zanardi, E. Ghidini, S. and Ianieri, A. 2015. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* on Food Contact Surfaces: Relationship with Temperature and Cell Surface Hydrophobicity. *Science Direct, Food Control*, volume 50: 930-936
- Delves, Peter J. Martin, Seamus J. Burton, Dennis R. and Roitt, Ivan M. 2011. *Roitt's Essential Immunology*. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd. : 3-273
- Djunaedi, Djoni. 2006. Jenis Bakteri dan Sensitivitas Antibiotik Pada Kasus Infeksi Nosokomial Akibat Pemasangan Kateter di RSSA Malang Dalam Periode November 2000-Maret 2001. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol XXII, No. 3. Hal 97-100
- Edward. Published on 2009. The Top Benefits of Ozonated Olive Oil. <http://www.globalhealingcenter.com/natural-health/ozonated-olive-oil/>.
- Diakses: 12 November 2016 jam 15.00 wib
- Fitriyanti, Sepvi. 2015. Faktor Yang Mempengaruhi Terjadinya Phlebitis Di Rumah Sakit Bhayangkara TK II. H.S. Samsorei Mertojoso Surabaya. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, Vol. 3, No.2: 217-229
- Faleiro, M.L. Miguel, M.G. 2013. *Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria in Fighting Multidrug Resistance With Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components (Mahendra Rai and Kateryna Kon editor)*. USA: Elsevier Inc. Pp. 65-86
- Flanagan, Madeleine. 2013. *Wound Healing and Skin Integrity*. USA: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 33-48
- Fournier, Benedicte. Philpott, Dana J. 2005. Recognition of *Staphylococcus* by the Innate Immune System. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 18, No. 3: 521-540
- Gomes, F. Leite, B. Teixeira, P. and Oliveira, R. 2011. Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Mendez-Villas (Ed.)*: 843-852
- Galkowska, H. Podbielska, A. Olszewski, Waldemar L. Stelmach, E. Luczak, M. Rosinski, G. and Karnafel, W. 2009. Epidemiology and Prevalence Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* And *Staphylococcus epidermidis* In Patients With Diabetic Foot Ulcers: Focus On The Differences Between Species Isolated From Individuals With Ischemic vs Neuropathic Foot Ulcers. *Elsevier Ireland Ltd: Diabetes Research And Clinical Practice* 84. Pp 187-193
- Gaynes, Robert. Edwards, J.R. 2005. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Healthcare Epidemiology, Clinical Infections Diseases*; 41: 848-54

- Galvan-Pena, Silvia. O'Neill, Luke A.J. 2014. Metabolic Reprogramming in Macrophage Polarization. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 5, article 420. Pp. 275-279. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Han, Seung-Kyu. 2016. *Innovations and Advances in Wound Healing second edition*. USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Pp. 1-28
- Haihua, Zhang. Weixiao, Nan. Shiyong, Wang. Tietao, Zhang. Huazhe, Si. Datao, Wang. Fuhe, Yang. and Guangyu, Li. 2016. Epidemal Growth Factor Promotes Proliferation of Dermal Papilla Cells Via Notch Signalling Pathway. *Biochimie, Elsevier Ltd*;127: 10-18
- Hammer, Katherine A. Carson, Christine F. 2011. *Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Lipids and Essential Oil as Antimicrobial Agents (Halldor Thormar ed)*. USA: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 256-295
- Holland, Steven M. Loveless, James. and Beck, Lisa A. 2008. *Regulation of the Production and Activation of Neutrophils and Eosinophils in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 279-288
- Italiani, Paola. Boraschi, Diana. 2014. From Monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical versus Functional Differentiation. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 5, article 514. Pp. 47-63. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Ito, Teruyo. Kuwahara-Arai, Kyoko. Katayama, Yuki. Uebara, Yuki. Han, Xiao. Kondo, Yoko. and Hiramatsu, Keiichi. 2014. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Analysis of MRSA in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocol, *Methods in Molecular Biology second edition*. Springer Science+Business Media, LLC. Vol. 1085. Pp. 131-146
- Ishii, Ken J. Akira, Shizuo. 2008. *Nucleic Acid in Innate Immunity*. USA: Taylor & Francis Group. Pp. 43-55
- Kumar, Vinay. Abbas, Abul K. Aster, Jon C. 2015. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease Ninth Edition*. Canada: Saunders, Elsevier.inc. Pp. 31-112
- Koh, Timothy J. Dipietro, Luisa Ann. 2013. Inflammation and Wound Healing: The Role of The Macrophage. *NIH Public Access Author Manuscript*; 13: 1-14. doi: 10.1017/S1462399411001943
- Kristmundsdottir, Thordis. Skulason, Skuli. 2011. *Lipids as Active Ingredients in Pharmaceuticals, Cosmetics and Health Foods in Lipids and Essential Oil as Antimicrobial Agents (Halldor Thormar ed)*. USA: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 152-171
- Kwakman, Paulus H.S. A. te. Velde, Anje. Vandenbroucke-Grauls, Christina M.J.E. et al. 2006. Treatment and Prevention of Staphylococcus epidermidis Experimental Biomaterial-Associated Infection by Bactericidal Peptide 2. *American Society for Microbiology, Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: p. 3977-83. doi:10.1128/AAC.00575-06
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Jogjakarta:Gajah Mada University Press. Pp.5-8, 25-45, 71-77, 82-112
- Li Jie, Kirsner Robert S, 2005. *Extracellular Matrix and Wound Healing In Falabella AF, Krisner RS (eds), Wound Healing*. New York: Taylor & Francis Group, pp.39-48
- Murphy, Kenneth. 2017. *Janeway's Immunobiology 9th Edition*. USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. Pp. 37-256, 345-398
- Murray, Patrick R. Rosenthal, Ken S. and Pfaller, Michael A. 2016. *Medical Microbiology 8th Edition*. Philadelphia: Elsevier Inc. Pp. 34-96, 170-182

- Marta, Zapotoczna. Hannah, McCarthy. Justine K, Rudkin. James P, O’Gara. and Eoghan, O’Neill. 2015. An Essential Role for Coagulase in *Staphylococcus aureus* Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, volume 212, issue 12: 1883-1893
- Mills, Charles D. Lenz, Laurel L. Ley, Klaus. 2014. Macrophages at The Fork in The Road to Health or Disease. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 6, article 59. Pp. 7-10. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Mills, Charles D. Thomas, Anita C. Lens, Laurel L. Munder, Markus. 2014. Macrophage: SHIP of Immunity. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 5, article 620. Pp. 42-46. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Marra, Andrea. 2014. Animal Models in Drug Development for MRSA in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocol, Methods in Molecular Biology second edition. Springer Science+Business Media, LLC*. Vol. 1085. Pp. 333-344
- Mogensen, Trine H. 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signalling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 22, No.2: 240-273
- Modlin, Robert L. Kim, Jenny. Maurer, Dieter. Bangert, Christine. and Stingl, Georg. 2008. *Innate and Adaptive Immunity in the Skin in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick’s Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 95-114
- McGrath, John A. McLean, W.H. and Irwin. 2008. *Genetics in Relation to the Skin in the Skin in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick’s Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 73-86
- Miller, Stanley J. Sun, Tung-Tien. and Coulombe, Pierre A. 2008. *Epidermal Growth and Differentiation in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick’s Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 375-382
- Michalik, Liliane. Wahli, Walter. 2006. Involvement of PPAR Nuclear Receptors in Tissue Injury and Wound Repair. *The Journal of Clinical Investigation (http://www.jci.org)*, volume 116, number 3: 598-606
- Nan, Wang. Hongwei, Liang. and Ke, Zen. 2014. Molecular Mechanism that Influence the Macrophage M1-M2 Polarization Balance. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 5, article 614. Pp. 230-236. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Nugraheni, Ratna. Suhartono. Winarni, S. 2012. Infeksi Nosokomial di RSUD Setjonegoro Kabupaten Wonosobo. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, Vol 11 / No.1. Hal: 95-100
- Nabavian, Reza. Garner, Warren L. 2002. Normal Wound Healing. *LAC/USC Burn Center*: 1-19
- Orstead, H.L. Keast, David. Lalande, L.F. and Francoise, Marie. 2011. Basic Principles of wound healing. *Wound care Canada*, 9 (2): 4-12
- Otto, Michael. 2009. *Staphylococcus epidermidis - The “Accidental” Pathogen. NIH Public Access Author Manuscript*; 7(8): 555-567. doi:10.1038/nrmicro2182
- Portou, M.J. Baker, D. Abraham, D. and Tsui, J. 2015. The Innate Immune System, Toll-Like Receptors and Dermal Wound Healing: A Review. *Vascular Pharmacology* 71 (www.elsevier.com/locate/vph): 31-36
- Palavecino, Elizabeth L. 2014. Clinical, Epidemiologic, and Laboratory Aspect of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus*

- aureus* (MRSA) Protocol, Methods in Molecular Biology second edition. Springer Science+Business Media, LLC. Vol. 1085. Pp. 1-19
- Proksch, Ehrhardi. Jensen, Jens-Michael. 2008. *Skin as an Organ of Protection in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 383-394
- Petzelbauer, Peter. Peng, Lisan S. and Pober, Jordan S. 2008. *Endothelium in Inflammation and Angiogenesis in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 1585-97
- O'Gara, James P. Humphreys, Hillary. 2001. *Staphylococcus epidermidis* Biofilms: Importance and Implications. *J. Med Microbiol*, Vol. 50: 582-587
- Rath, Meera. Mülle, Ingrid. Kropf, Pascale. Closs, Ellen I. and Munder, Markus. 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase; Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 5, article 532. Pp. 13-19. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
- Reddy, G.A.K. Priyanka, B. Saranya, Ch.S. and Kumar, C.K.A. 2012. Wound Healing Potential Of Indian Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacy Review & Research*. Vol: 2. pp. 58-75
- Ranzato, Elia. Burlando, Bruno. 2011. *Signalling Pathways in Wound Repair in Wound Healing: Process, Phases, and Promoting*, Jane E. Middleton (ed.). New York: Nova Science Publishers Inc. Pp. 123-135
- Rodero, Mathieu P. Khosrotehrani, Kiarash. 2010. Review Article: Skin Wound Healing Modulation by Macrophages. *Int J Clin Exp Pathol (www.ijcep.com)*; 3(7): 643-653
- Rupp, Mark E. Fey, Paul D. Heilmann, C. and Gotz, F. 2001. Characterization of the Importance of *Staphylococcus epidermidis* Autolysin and Polysaccharide Intercellular Adhesin in the Pathogenesis of Intravascular Catheter-Associated Infection in a Rat Model. *The Journal of Infections Diseases*; 183: 1038-42
- Sirokmany, G. Pato, Anna. Zana, Melinda. Donko, Agnes. Biro, Adrienn. Nagy, Peter. and Geiszt, Miklos. 2016. Epidermal Growth Factor (EGF)-Induced Hydrogen Peroxide Production is Mediated by Dual Oxidase I. *Free Radical Biology and Medicine* 97 (www.elsevier.com/locate/freeradbiomed): 204-211
- Sunhyo, Ryu. Peter I, Song. Chang Ho, Seo. Hyeonsook, Cheong. and Yoonkyung, Park. 2014. Review Colonization and Infection of the Skin by *Staphylococcus aureus*: Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides. *Int. J. Mol. Sci*, 15: 8753-8772. doi: 10.3390/ijms15058753
- Sowash, Madeleine G. Uhlemann, Anne-Catrin. 2014. Community-Associated Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Case Studies in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocol, Methods in Molecular Biology second edition. Springer Science+Business Media, LLC. Vol. 1085. Pp. 25-60
- Salgado-Pabon, Wilmar. Case-Cook, Laura C. and Schlievert, Patrick M. 2014. Molecular Analysis of Staphylococcal Superantigens in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocol, Methods in Molecular Biology second edition. Springer Science+Business Media, LLC. Vol. 1085. Pp. 169-193
- Soepribadi, I. 2013. Regenerasi dan Penyembuhan. Jakarta: Penerbit CV. Sagung Seto. Hal. 62-67
- Scemons, D. Elston, D. 2009. *Nurse to Nurse Wound Care*. USA: The McGraw-Hill Companies Inc. 21-55

- Sudiana, I.K. 2006. *Teknologi ilmu jaringan dan Imunohistokimia*. Jakarta: Penerbit CV. Sagung Seto. Hal: 1-49
- Tortora, G. J. Funke, B. R. and Case, C. L. 2016. *Microbiology An Introduction 12th Edition*. USA: Pearson Education Inc. Pp. 1-5, 73-91, 442-463, 579-583
- Tisserand, Robert. Young, Rodney. 2014. *Essential Oil Safety: a Guide for Health Care Professionals second edition*. UK: Churchill Livingstone Elsevier. Pp. 5-90
- Turgeon, Mary Louise. 2014. *Immunology and Serology in Laboratory Medicine Fifth Edition*. Missouri: Elsevier Mosby Inc. Pp. 30-99, 197-200
- Tang, Ling. Kirsner, Robert S. and Li, Jie. 2011. *Extracellular Matrix Molecules in Skin Wound Repair in Wound Healing: Process, Phases, and Promoting*, Jane E. Middleton (ed.). New York: Nova Science Publishers Inc. Pp. 49-71.2010.01.022
- Thormar, Halldor. 2011. *Antimicrobial Lipids and Innate Immunity in Lipids and Essential Oil as Antimicrobial Agents (Thormar Halldor ed)*. USA: John Wiley & Sons Ltd. Pp. 124-144
- Takeuchi, Osamu. Akira, Shizuo. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Elsevier inc: Cell* 140: 805-820. DOI 10.1016/j.cell
- Travers, Jeffrey B. Mousdicas, Nico. 2008. *Gram-Positive Infections Associated with Toxin Production in Klaus Wolff et al (ed.), Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine seventh edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 1710-19
- Traversa, B. Sussman, G. 2001. The Role of Growth Factors, Cytokines and Proteases in Wound Management. *Primary Intention*, Vol. 9, No. 4: 161-167
- Yang, Junshu. Ji, Yinduo. 2014. Investigation of *Staphylococcus aureus* Adhesion and Invasion of Host Cells in Yinduo Ji (ed.), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocol, Methods in Molecular Biology* second edition. *Springer Science+Business Media, LLC*. Vol. 1085. Pp. 187- 192
- Zhihong, Yang. Xiu-Fen, Ming. 2014. Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Frontiers Media SA (www.frontiersin.org): Perspective Article*, Vol. 5, article 633. Pp. 178-184. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420