

Pengaruh Induksi Hidrogen Peroksida 3% pada Tikus dengan Luka Iris Terhadap Sel Radang Mononuklear (Limfosit, Makrofag), Sel Nekrosis dan Jumlah Pembuluh Darah (Eksresi VEGF)

Harman Agusaputra, Troef Soemarno

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
 Surabaya*

ABSTRAK

Latar Belakang

Hidrogen peroksida 3% adalah larutan pembersih luka mempunyai banyak manfaat, salah satu diantaranya adalah merangsang angiogenesis, vaskulogenesis dan oksigenasi jaringan. Proses penyembuhan luka sangat dipengaruhi vaskulogenesis, angiogenesis dan oksigenasi. Selama ini pemberian H₂O₂ 3% pada luka/trauma hanya diberikan satu kali, sebagai pembersih. Proses penyembuhan luka dipengaruhi adanya aliran darah dan adanya sel radang terutama sel radang mononuklear (MN).

Tujuan

Menilai kegunaan hidrogen peroksida 3% pada pemberian kurang dari 7 hari dan mengungkap hubungan antara jumlah pembuluh darah dan jumlah sel radang MN dalam proses penyembuhan luka.

Metode

Dalam penelitian ini digunakan 48 ekor tikus Balb/c umur 9-10 minggu, 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Masing-masing dilakukan insisi pada bagian punggung tikus. Sebelumnya dilakukan anestesi, insisi dibuat 1cm sedalam subkutis. Pada kelompok kontrol tidak diberikan tetesan hidrogen peroksida, pada kelompok perlakuan diberikan tetesan hidrogen peroxide 3%, sebanyak 3 kali sehari. Pada kelompok 1 baik kontrol maupun perlakuan dilakukan biopsi pada hari ke2, kelompok 2 pada hari ke-4, kelompok 3 pada hari ke-8. Biopsi kulit dipulas dengan Hematoxylin Eosin (HE) untuk melihat jumlah sel radang, sedangkan untuk melihat angiogenesis, vaskulogenesis dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi VEGF.

Hasil

Didapatkan penurunan jumlah sel radang MN pada 1x24jam secara signifikan p0,018 (p<0,05) dan peningkatan nekrosis 1x24 jam p0,026 (p<0,05) dibanding dengan kontrol. Sedangkan 3x24jam dan 7x 24 jam tidak terdapat perbedaan. VEGF endotel tidak berbeda baik pada 1x24jam, 3x24jam dan 7x24 jam dengan (p>0,05). Tidak ada korelasi antara sel radang MN dan pembuluh darah dengan ekspresi VEGF p0,295 (p>0,05).

Kesimpulan

Terdapat penurunan jumlah sel radang MN dan peningkatan luas nekrosis pada 1x24 jam, dan tidak terdapat peningkatan jumlah endotel VEGF dalam waktu <7 hari dan tidak terdapat hubungan antara jumlah sel radang MN dan endotel (VEGF)

Kata Kunci : Hidrogen peroksida 3%, endotel, VEGF, penyembuhan luka

ABSTRACT

Background

Three percent hydrogen peroxide/3% is a liquid for cleaning wounds and is known to have many benefits such as stimulating vasculogenesis, angiogenesis and improve tissue oxygenation. These factors were needed in wound healing. In clinical practice the use of hydrogen peroxide 3% is not more than 1 day and only for cleansing not for inducing vasculogenesis and angiogenesis. Healing process depend on blood flow and mononuclear cells count.

Objective

To study the benefit of 3% hydrogen peroxide usaged in periode less than_7 days and to see the correlation between the number of blood vessels and MN count in the healing process.

Material and Methods

Forty eight Balb/C type mice, aged 9-10 weeks, devided into 6 groups, 3 groups of control dan 3 treatment group. Devided into 1x24 hours, 3x24 hours and 7x 24 hours. One centimeters incision was made on the back of each mouse, not penetrating the muscle. Control group did not get H₂O₂ given and treatment group 3 times daily. Biopsy was done in 2nd day for group 1, 4th day for group 2 and 8th day for group 3. The biopsy specimens were stained using hematoxylin eosin (HE) to examine limfoid cells, and angiogenesis was conformed get IHC using antibody against VEGF.

Result

Compared with control group, there was significans decrease of Mononuclear cells but not in 2nd and 3rd group. No differencies was found in endothelial proliferation as well as correlation between vascular amount and MN cells.

Conclusion

There was significant decrease in MN cells and increase of necrotic cells amounts in 1x24 hours, but no increase VEGF expression in endotels in ≤7 days. No correlation was found between MN cells and VEGF expression in endothel

Keyword : *Hidrogen Peroxide 3%, VEGF expression in endothel, Wound Healing*

PENDAHULUAN

Hidrogen Peroksida 3% merupakan bahan yang sudah dikenal sejak lama, dimana mempunyai banyak kegunaan, antara lain, membersihkan luka dengan efek buihnya,¹ vasokonstriksi pembuluh darah, dan mengidentifikasi perdarahan yang tersembunyi². Pada beberapa penelitian terakhir dilaporkan bahwa pemberian hidrogen peroksida 3% dapat meningkatkan oksigenasi jaringan³, meningkatkan angiogenesis dan vaskulogenesis.^{4,5} Dengan demikian terdapat kemiripan antara proses penyembuhan luka yang membutuhkan angiogenesis dan oksigenasi dengan kemampuan hidrogen peroksida. Secara klinis selama ini pemberian hidrogen peroksida dibatasi tidak boleh lebih dari sehari, oleh karena akan memperlambat penyembuhan luka. Penggunaan hidrogen peroksida 3% paling sering adalah pada luka kotor dan abses.

Perlambatan proses penyembuhan luka ini antara lain karena efek proteolisis pada jaringan luka, efek apoptosis neutrofil, efek penghambatan pembentukan kolagen⁴, bahkan dilaporkan pula beberapa efek dari pembilasan luka operasi yang menyebabkan emboli gas pada pembuluh darah vena^{6,7}.

Berdasarkan uraian diatas, terdapat 2 pendapat yang berbeda, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai proses penyembuhan luka yang dihubungkan dengan proses peradangan, proses terbentuknya pembuluh darah, dan dibatasi dengan kerusakan jaringan yang dinilai dari nekrosis yang terjadi. Diharapkan terdapat perbedaan antara peningkatan peradangan mononuklear yang akan mengaktifasi faktor pertumbuhan salah satunya peningkatan angiogenesis, dan dibatasi dengan peningkatan luasnya nekrosis. Dengan demikian dapat diharapkan masih perlukah hidrogen peroksida diberikan dalam waktu hari 1 sampai 7 hari. Selain itu akan diteliti adanya korelasi antara jumlah sel radang MN dan jumlah pembuluh darah yang dilihat dengan ekspresi VEGF.

METODE PENELITIAN

Digunakan 48 ekor tikus jenis Balb/C dengan kriteria, jantan, umur 8-10 minggu, berat antara 40-43gr, di Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Semua tikus diberikan lokal anestesi sprai pada punggung, kemudian dilakukan insisi punggung sebesar 1cm sedalam subcutis, tidak sampai

menembus otot. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok yaitu control dan perlakuan: yang pertama diberikan tetesan hidrogen peroksida 3% 3x1 per hari sebagai kelompok perlakuan dan kelompok kedua (separuhnya) tanpa ditetesi sebagai kelompok kontrol. Kedua kelompok tersebut dibagi lagi menjadi 3 kelompok kecil masing-masing hari ke-1, hari ke-3 dan hari ke-7 dan akan dibiopsi pada waktu itu. Saat sebelum dibiopsi tikus dikorbakan dan setelah di biopsi tikus tidak dipakai. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Hematoxylin Eosin (H&E) pada biopsi dan pulasan imunohistokimia dengan menggunakan Antibodi VEGF-Ab1 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga-Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo, dan Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada-Rumah Sakit Umum Dr. Sardjito.

Definisi sel radang Mononuklear yang dimaksud adalah sel limfosit dan sel makrofag. Gambaran sel limfosit sel berukuran kecil, inti bulat sitoplasma tipis. Sel makrofag: sel yang berasal dari monosit didalam darah, sel berinti vesikuler atau berbentuk kacang dan banyak sitoplasmanya. Eosinofil dan sel plasma tidak termasuk dalam hitungan. Nekrosis merupakan sel yang tampak sisa sitoplasma berwarna eosinofilik, tidak tampak adanya inti sel. Dalam penelitian tidak dilakukan penghitungan sel yang mengalami apoptosis/sel yang mengalami fragmentasi. Ekspresi Antibodi VEGF ini dibaca oleh 2 orang yaitu seorang spesialis patologi anatomic dan peneliti. Dikatakan positif bila sel endotel sitoplasma dan membrane terwarni coklat dengan intensitas cukup-kuat, dan tampak struktur lumen serta sel darah merah.

Penghitungan dalam mikroskop dilakukan 5 lapang pandang pada dasar penampang dari epitel yang rusak dengan bantuan alat hitung *graticule* 1,25mm x 1,25mm (5x5 kotak) per 1 lapang pandang.

Analisis Statistik dilakukan dengan uji komparasi pada ke-2 kelompok masing-masing waktu 1x24 jam, 3x24 jam dan 7x24jam dengan *independent samples t-test* baik pada penghitungan sel radang MN, sel nekrosis dan ekspresi VEGF endotel. Selain itu dilakukan Uji Korelasi Pearson untuk melihat hubungan sel radang mononuklear dan ekspresi VEGF endotel. Kesemuanya tersebut harus dilakukan uji normalitas sampel terlebih dahulu.

HASIL

Data Sel radang MN yang diperoleh berdistribusi normal dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Hasil *independent samples t-test* menunjukkan nilai yang bermakna dengan nilai p 0,018 ($p < 0,05$) pada kelompok 1x24 jam, sedangkan 3x24 jam dan 7x24 jam menunjukkan nilai yang tidak bermakna p 0,158 dan p 0,177 ($p > 0,05$). Data menunjukkan bahwa terdapat penurunan sel radang MN pada awal 1x24 jam dan pada waktu 3x24 dan 7x24 tidak terdapat penurunan dibanding kelompok kontrol.

Data sel nekrosis yang diperoleh berdistribusi normal dengan uji Kolmogorov-Smirnov test, hasil *independent samples t-test* menunjukkan ada peningkatan sel nekrosis secara bermakna pada 1x24 jam p 0,026 ($p < 0,05$) sedangkan 3x24 jam dan 7x24 jam tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan p 0,166 dan p 0,804 ($p > 0,05$).

Data pembuluh darah (VEGF) yang diperoleh berdistribusi normal dengan uji Kolmogorov-Smirnov, hasil *independent samples t-test* menunjukkan pada 1x24jam, 3x24 jam dan 7x24 jam tidak terdapat perbedaan yang bermakna p 0,742, 0,962 dan 0,557 ($p > 0,05$).

Tabel 1. Korelasi antara jumlah sel mononuklear dan jumlah pembuluh darah.

	Mean+SD	P
MN	122,62+68,75	0,295
VEGF	12,96+2,926	0,295

Hasil Uji korelasi Pearson menunjukkan tidak ada korelasi antara jumlah sel Mononuklear (limfosit dan makrofag) dengan jumlah endotel (p 0,295).

DISKUSI

Hasil penelitian ini tampaknya terjadi keterlambatan keluarnya sel radang MN ke tempat injuri, pada 1x24 jam. Pada beberapa penelitian yang telah ada penghitungan jumlah sel radang MN seperti makrofag dan limfosit belum pernah dilakukan. Tampaknya keterlambatan keluarnya sel radang dimungkinkan oleh efek vasokonstriksi pembuluh darah, sehingga *vascular leakage* ke tempat injuri menjadi lebih sedikit, dengan efek sel radang ke tempat injuri menjadi lebih menurun. Tetapi selanjutnya pada 3x24 dan 7x24 jam tidak berbeda dibanding kontrol. Pada penelitian

Nogami M dkk (2007) mengatakan terjadi peningkatan sel radang MN pada 3-4 hari setelah injuri.⁸ Pada penelitian ini terjadi peningkatan sel radang MN 1x24 jam antar kelompok perlakuan dari 28,88 menjadi 169,5 pada 3x24jam sesuai dengan Nogami M dkk (2007) .

Penelitian terjadi efek kerusakan jaringan pada 1x 24 jam yang lebih tinggi pada penelitian ini dibanding dengan kontrol, pada tingkat selanjutnya tidak terdapat perbedaan dengan waktu 3x24jam dan 7x24 jam. Walaupun terjadi peningkatan pada 3x24jam dan 7x24 jam namun tidak bermakna pada hitungan statistik. Statsna AJ dkk (2001) menyatakan efek pemberian hidrogen peroksida pada percobaan *invitro* didapatkan 2 mekanisme kematian sel yaitu nekrosis dan apoptosis. Pada laporan kasus Jacobson (2004) menyatakan terjadi nekrosis fasiitis pada pemberian hidrogen peroksida pada pasien selulitis yang diirigasi¹⁰. Tampaknya memang terjadi nekrosis yang jelas pada pemberian hidrogen peroksida dan lebih banyak dibanding dengan kontrol pada penelitian ini.

Lee KS dkk (2006) memberikan hidrogen peroksida 1-3% dengan cara inhalans dalam waktu 12 jam pada cairan *Bronkoalveolar lavage* didapatkan mRNA VEGF yang meningkat secara bermakna.⁵ Zhu JW dkk (2002) meneliti sel pada Ca colon tampaknya mRNA VEGF meningkat dalam waktu 24 jam.¹¹ Nielsen NN dkk (1998) melihat penyembuhan luka pada pasien setelah operasi tanpa diberikan hidrogen peroksida terjadi peningkatan mRNA VEGF dalam waktu 3 sampai 7 hari.⁶ Nogami M dkk (2007) menggunakan tikus dengan melakukan insisi tanpa pemberian hidrogen peroksida terjadi peningkatan mRNA VEGF pada hari ketiga.⁸ Hal ini semua dapat memperlihatkan sebenarnya dalam waktu 12 jam-3 hari terjadi peningkatan mRNA VEGF, akan tetapi ekspresi mRNA VEGF tidak hanya sel Endotel saja tetapi dapat ditemukan di fibroblast, polimorpho nuclear (PMN) dan Makrofag. Xiong M dkk (1998) menganalisis VEGF melalui cairan intra peritoneal pada tikus, dikondisikan dalam keadaan hipoksia, dengan rangsangan Interferon/*Lipopolisakarid endotoxin*, dilakukan paparan selama 6jam 18 jam dan 48 jam, Hasil pemeriksaan cairan serum dilakukan pemeriksaan dengan RT-PCR, menunjukkan peningkatan yang nyata mRNA VEGF pada kondisi

hipoksia dibanding dengan kontrol.¹² Pada penelitian kami dari observasi tampaknya tidak terdapat pembedaan dan luka yang kami kondisikan adalah luka iris yang bersih dengan demikian kemungkinan terjadinya hipoksia yang berarti adalah rendah. Berbeda dengan diberikan rangsangan endotoksin seperti pada percobaan Xiong M dkk (1998).

Uji Korelasi menunjukkan tidak tampak hubungan yang bermakna antara sel radang MN dan peningkatan jumlah endotel pembuluh darah, adapun faktor yang mungkin mempengaruhi adalah kondisi rangsangan hipoksia yang kurang.

KESIMPULAN.

Terdapat perbedaan penurunan sel radang MN pada 1x24 jam dibanding dengan kontrol dan tidak terdapat perbedaan 1x24 jam dan 7x24 jam

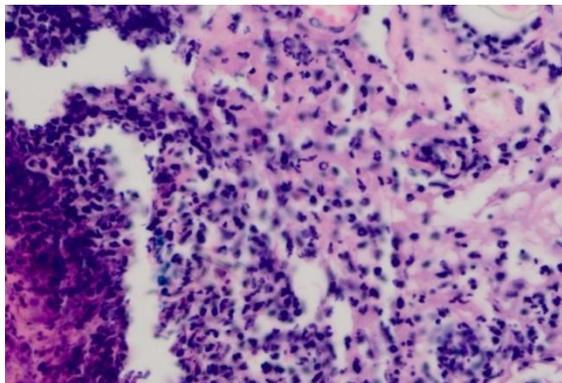
Terdapat perbedaan peningkatan sel nekrosis kelompok perlakuan pada 1x24 jam dibanding dengan kontrol. Tidak terdapat perbedaan 3x24 jam dan 7x24 jam.

Tidak terdapat perbedaan jumlah sel endotel dengan ekspresi VEGF pada 1x24jam, 3x24 jam dan 7x24 jam.

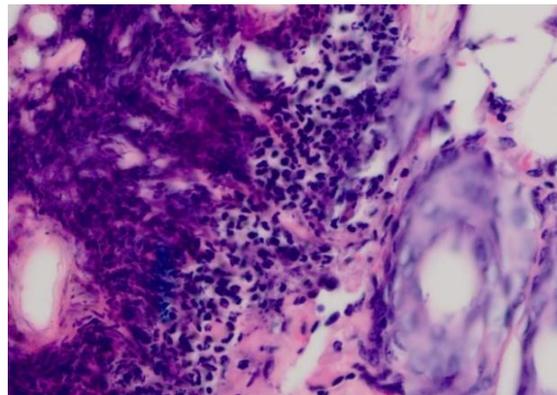
Tidak ada korelasi antara sel radang MN dengan endotel (VEGF) .

Dengan demikian Induksi Hidrogen peroksida tidak perlu diberikan setelah 1x24 jam karena tidak bermakna. Pada pemberian hydrogen peroksida harus tetap ekstra hati-hati terhadap luka terbuka terutama vaskuler dan mungkin adalah kontra indikasi dan cara pembersihan harus gentle.

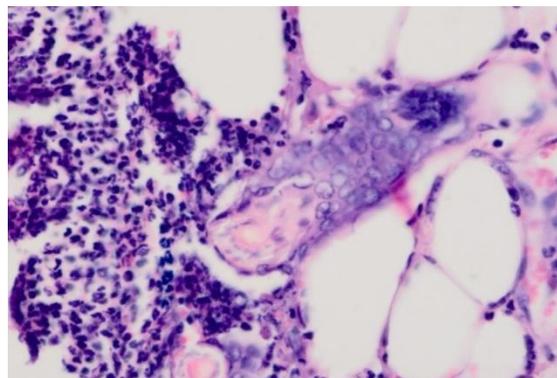
Gambar :



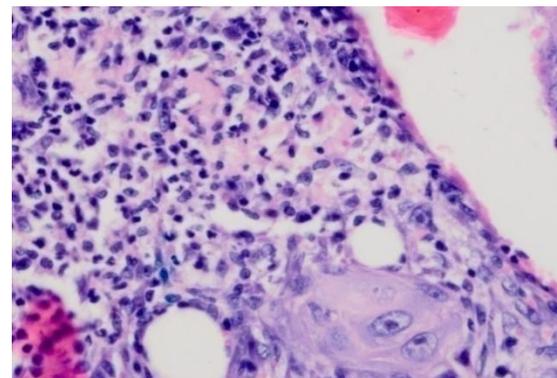
Gambar A. HE 400x, Perlakuan 1x24 jam tampak sel radang PMN luas,



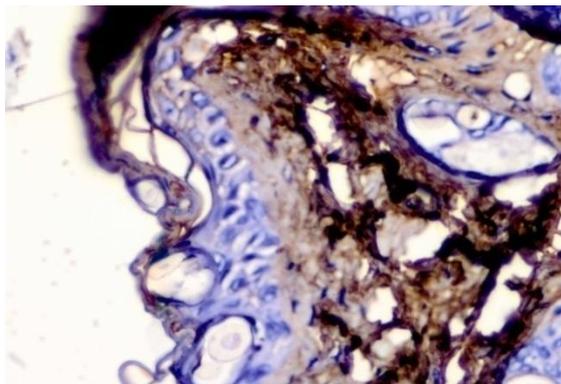
Gambar B. HE 400x, Perlakuan 1x24jam Pada perbatasan epitel tampak sel nekrosis, tanpa inti dengan sitoplasma eosinofilik



Gambar C. HE 400x, Perlakuan 1x 24 jam, tampak sel radang PMN dan MN, makrofag



Gambar D. HE 400x ,Perlakuan 3x 24 jam, tampak sel radang MN lebih dominant



Gambar E. HE 400x, Perlakuan hari 1. VEGF pada Endotel... pembuluh darah

DAFTAR PUSTAKA

1. Jones PM, Segal SH. Venous oxygen embolism produced by injection of hydrogen peroxide into an enterocutaneous fistula. *Anaesth Analg* 2004;99:1861-3.
2. Morikawa H, Mima H, Fujita H, Mishima S. Oxygen embolism due to hydrogen peroxide irrigation during cervical spine surgery. *Can J Anaesth* 1995;42:231-3.
3. Raposio E, Santi PL. Pharmacological enhancement of cutaneous flap survival with topical dimethyl sulphoxide and hydrogen peroxide. *J Surg Plastic* 1998;51:551-4.
4. Cho M, HUNT TK, Hussain MZ. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:2357-63.
5. Lee KS, Kim SR, Park SJ, Min KH, Lee MH, Jin SM, Jin GY, Yoo WH and Lee YC. Hydrogen peroxide induced permeability via regulation of vascular endothelial growth factor. *Am J Respir Cell Mol Bio* 2006;35:190-7.
6. Nielsen NN, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor mediated angiogenic activity during the Proliferative Phase of Wound Healing. *Am J Pathol* 1998;152: 1445-52.
7. Halter G, Faltin E, Faltin D, Kern C. Oxygen embolism after hydrogen peroxide irrigation of vulvar abscess. *Br J Anaesth* 2002; 88(4): 597-9.
8. Nogami M, Hoshi T, Kinoshita M, Arai T, Takama M, Takanashi I. Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Med Mol Morphol*; 2007;40: 82-87.
9. Stastna A.J, SEDLACKOVA M. Submicroscopic changes in the production of hydrogen peroxide in necrotic and apoptotic cells of the mouse postovulatory cumulus oophorus. *Scripta Medica* 2001;74:209-22.
10. Jacobson MD. The wrong solution. *Emerg Med* 2004; 36:13-14.
11. Zhu JW, Bao Yu BM, Ji YB, Zheng MH, Hua D. Up regulation of vascular endothelial growth factor by hydrogen peroxide in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:153-7.
12. Xiong M, Elson G. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages. Regulation by Hypoxia, Lactate and Inducible NOS pathway. *Am J Pathol* 1998;153:587-598.