

**UJI AKTIVITAS *IN VIVO* PEMBALUT LUKA
YANG MELEPASKAN *S-NITROSOGLUTHATIONE* DARI *SELF-HEALING HYDROGEL*
POLIVINIL ALKOHOL/BORAKS YANG DIPERKUAT *N-CARBOXYMETHYL CHITOSAN*
TERHADAP LUKA TERINFEKSI POLIBAKTERI**

***IN VIVO* ACTIVITY OF WOUND DRESSING
SELF-HEALING HYDROGEL POLIVINIL ALCOHOL/BORAX RELEASING *S-*
NITROSOGLUTHATIONE REINFORCED WITH *N-CARBOXYMETHYL CHITOSAN* ON
POLYBACTERIAL INFECTED WOUNDS**

NUR ALIFAH

N012211034



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS/ SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**UJI AKTIVITAS *IN VIVO* PEMBALUT LUKA
YANG MELEPASKAN *S-NITROSOGLUTATHIONE* DARI
SELF-HEALING HYDROGEL POLIVINIL ALKOHOL/BORAKS YANG DIPERKUAT *N-CARBOXYMETHYL CHITOSAN* TERHADAP LUKA TERINFEKSI POLIBAKTERI**

**NUR ALIFAH
N012211034**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS/ SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

***IN VIVO* ACTIVITY OF WOUND DRESSING
SELF-HEALING HYDROGEL POLIVINIL ALCOHOL/BORAX RELEASING S-
NITROSOGLUTHATIONE REINFORCED WITH N-CARBOXYMETHYL CHITOSAN ON
POLYBACTERIAL INFECTED WOUNDS**

**NUR ALIFAH
N012211034**



**MASTER OF PHARMACY STUDY PROGRAM
FACULTY/GRADUATE SCHOOL
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR
2024**

**UJI AKTIVITAS *IN VIVO* PEMBALUT LUKA
YANG MELEPASKAN *S-NITROSOGLUTHATIONE* DARI
SELF-HEALING HYDROGEL POLIVINIL ALKOHOL/BORAKS YANG DIPERKUAT *N-CARBOXYMETHYL CHITOSAN* TERHADAP LUKA TERINFEKSI POLIBAKTERI**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi

Disusun dan diajukan oleh

NUR ALIFAH

N012211034

kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS/ SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN

UJI AKTIVITAS *IN VIVO* PEMBALUT LUKA
YANG MELEPASKAN *S-NITROSOGLUTHATIONE* DARI
SELF-HEALING HYDROGEL POLIVINIL ALKOHOL/BORAKS YANG DIPERKUAT *N-CARBOXYMETHYL CHITOSAN* TERHADAP LUKA TERINFEKSI POLIBAKTERI

Disusun dan diajukan oleh

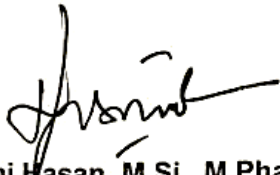
NUR ALIFAH
N012211034

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi
Magister Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Pada tanggal
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm.Sc.,
Ph.D., Apt
NIP. 198601162010122009

Pembimbing Pendamping,



Rina Agustina M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt
NIP. 198408212010122005

Ketua Program Studi,
Magister Fakultas Farmasi



Muhammad Aswad, S.Si. M.Si. Ph.D. Apt
NIP. 198001012003121004

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Ref. nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 1992032 002

**PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Uji Aktivitas In Vivo Pembalut Luka Yang Melepaskan *S-Nitrosoglutathione* Dari Self-Healing Hydrogel Polivinil Alkohol/Boraks Yang Diperkuat *N-Carboxymethyl Chitosan* Terhadap Luka Terinfeksi Polibakteri" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing, Ibu Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. dan Ibu Rina Agustina, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal (Gels MDPI) sebagai artikel dengan judul "*Clindamycin-releasing Polyvinyl Alcohol with Self-healing Property for the Effective Treatment of Biofilm-infected Wounds*". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 2024



NUR ALIFAH
N012211034

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis berjudul “Uji Aktivitas In Vivo Pembalut Luka Yang Melepaskan S-Nitrosogluthatione Dari Self-Healing Hydrogel Polivinil Alkohol/Boraks Yang Diperkuat N-Carboxymethyl Chitosan Terhadap Luka Terinfeksi Polibakteri” sebagai syarat memperoleh gelar magister di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam tak lupa penulis kirimkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabat serta penerus beliau. Penulis menyadari bahwa dalam menyusun tesis ini begitu banyak kendala yang dialami. Namun, berkat adanya bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga pada akhirnya dapat terselesaikan. Adapun pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang sedalam-dalamnya kepada yang terhormat :

1. Ibu Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan dosen penasehat Akademik yang telah membimbing, meluangkan waktu, memberikan arahan serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan masa studi selama di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Rina Agustina, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan serta saran kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
3. Bapak Prof. Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D., Apt., Bapak Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt. Selaku tim komisi pengujian yang telah memberikan banyak kritik membangun dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.
4. Dekan, Wakil dekan, seluruh staf dosen, pegawai Fakultas, Laboran Lab Biofar (Kak Cia, Pak Ical, Kak Nure) Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas segala ilmu, bantuan, fasilitas, serta diskusi-diskusi yang telah banyak membantu penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan tesis ini.
5. Kedua Orang tua penulis, (Alm) Hamzah, SE & (Almh) Mardiana, Kakak Penulis (Nur Ulfawati Hadi & Muh. Ilham Hadi), Keponakan Penulis (Adzkiya & Khalid) yang selalu memberikan doa, cinta, pengorbanan, motivasi, dan dukungan baik moril maupun materiil saat penulis menjalani pendidikan.
6. Teman sepembimbing (*Self-Healing Squad*: Widya Lutfiyah & Juliana Palungan), juga Ghina Ramadhani, dan kak Muhammad Thoha yang telah memberikan banyak support dan bantuan dalam menjalani suka duka penelitian.
7. Semua pihak yang telah membantu dan tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.
8. Terakhir, ucapan terima kasih kepada diri sendiri untuk segala kerja keras dan usaha untuk menumbuhkan kembali semua dorongan, harapan, semangat, serta keyakinan diri selama masa studi penulis berlangsung.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT akan membalas segala kebaikan dari semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis akan selalu menerima saran dan masukan demi perbaikan di masa yang akan datang. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya, dan ilmu Kefarmasian pada khususnya. Aamiin.

Makassar, 2024

Penulis,

NUR ALIFAH

ABSTRAK

NUR ALIFAH. **Uji Aktivitas In Vivo Pembalut Luka yang Melepaskan S-Nitrosogluthatione dari Self-Healing Hydrogel Polivinil Alkohol/Boraks yang Diperkuat N-Carboxymethyl Chitosan terhadap Luka Terinfeksi Polibakteri** (Dibimbing oleh NURHASNI HASAN dan RINA AGUSTINA)

Latar Belakang. Pembalut luka *self-healing hydrogel* berfungsi sebagai solusi untuk infeksi bakteri. Infeksi biofilm bakteri dapat mengancam nyawa. S-Nitrosogluthathione (GSNO), merupakan donor *Nitric Oxide* (NO), memiliki aktivitas anti bakteri dan anti biofilm yang poten. Sediaan *self-healing hydrogel* yang melepaskan NO memiliki keuntungan bila dioleskan pada lokasi luka yang banyak gerakan atau gesekan dimana sediaan ini dapat menyambung kembali setelah robek. Penelitian ini melibatkan pengembangan pembalut luka *self-healing hydrogel* yang mampu melepaskan NO untuk luka yang terinfeksi polibakteri biofilm. Polivinil alkohol (PVA) dan karboksimetilkitosan (KmK) digunakan sebagai *gelling polymer* dan boraks (B) sebagai agen pengikat silang. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas in vivo penyembuhan luka, antibakteri, dan antibiofilm dari *self-healing hydrogel* PVA-B-KmK yang melepaskan NO (PVA-B-KmK/GSNO) pada model luka terinfeksi polibakteri biofilm. **Metode.** Mencit jantan diinduksi luka polibakteri (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, rasio 1:1:1) menggunakan *biopsy punch* 8 mm dan pembentukan biofilm teramati 2 hari *post-injury*. Luka kemudian dibalut dengan *blank self-healing hydrogel* (PVA-B-KmK) dan PVA-B-KmK/GSNO setiap interval 2 hari. **Hasil.** In vivo biofilm terbentuk 2 hari *post-injury*. Sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KmK/GSNO mampu menghilangkan beban luka akibat bakteri sebesar 3-log reduction (membunuh 99,9%). NO-releasing *self-healing hydrogel* juga mampu mendispersi biofilm pada luka. Sebagai tambahan, luka yang diobati dengan PVA-B-KmK/GSNO juga memberikan aktivitas penyembuhan luka yang signifikan ($P < 0,05$) dengan persentasi penutupan luka sebesar 94,83%. Pewarnaan *H&E* dan *Masson's Trichrome* menunjukkan PVA-B-KmK/GSNO mempercepat re-epitelialisasi dan deposisi kolagen. **Kesimpulan.** Sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KmK/GSNO pada penelitian ini memiliki aktivitas penyembuhan luka yang poten pada model luka terinfeksi polibakteri biofilm. Oleh karena itu, pembalut luka ini mewakili hidrogel pelepas NO yang menjanjikan untuk pengobatan luka kronis yang terinfeksi biofilm.

Kata Kunci: S-Nitrosogluthatione, Self-healing hydrogel, polibakteri, antibakteri, antibiofilm, penyembuhan luka

ABSTRACT

NUR ALIFAH. **In Vivo Activity of Wound Dressing Self-Healing Hydrogel Polyvinyl Alcohol/Borax Releasing S-Nitrosogluthatione Reinforced With N-Carboxymethyl Chitosan on Polybacterial Infected Wounds** (Supervised by NURHASNI HASAN and RINA AGUSTINA)

Background. Self-healing hydrogel wound dressings serve as a solution for bacterial infections. Bacterial biofilm infections can be life-threatening. S-Nitrosogluthatione (GSNO), a nitric oxide (NO) donor, has potent antibacterial and anti-biofilm activities. Self-healing hydrogel preparations that release NO have the advantage when applied to wound sites that have a lot of movement or friction, where this preparation can reconnect after tearing. This study involved the development of a self-healing hydrogel wound dressing that can release NO to treat wounds infected with polybacterial biofilm. Polyvinyl alcohol (PVA) and carboxymethylchitosan (CmC) were used as gelling polymers and borax (B) as a cross-linking agent. **Aim.** This study aimed to determine the in vivo wound healing, antibacterial, and antibiofilm activities of the self-healing hydrogel PVA-B-KmK that releases NO (PVA-B-KmK/GSNO) in a polybacterial biofilm-infected wound model. **Method.** Male mice were induced with polybacterial-infected wounds (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, ratio 1:1:1) using an 8 mm biopsy punch and biofilm formation observed 2 days post-injury. The wound was then dressed with blank self-healing hydrogel (PVA-B-KmK) and PVA-B-KmK/GSNO at a 2 day interval. **Results.** In vivo biofilm was formed 2 days post-injury. The self-healing hydrogel preparation PVA-B-KmK/GSNO was able to eradicate the bacterial wound burden by 3-log reduction (99.9% killing). NO-releasing self-healing hydrogel was also able to disperse biofilm in wounds. In addition, wounds treated with PVA-B-KmK/GSNO also provided significant wound healing activity ($P < 0.05$) with a percentage of wound closure of 94.83%. The H&E dan Masson's Trichrome showed that PVA-B-KmK/GSNO accelerated re-epithelialization and collagen deposition. **Conclusion.** The self-healing hydrogel PVA-B-KmK/GSNO prepared in this study has potent wound healing activity in a polybacterial biofilm-infected wound model. Therefore, this wound dressing represents a promising NO-releasing hydrogel for the treatment of chronic wounds infected with biofilms.

Keywords: S-Nitrosogluthatione, self-healing hydrogel, polybacterial, antibacterial, antibiofilm, wound healing

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN	PENGESAHAN
.....	Err
or! Bookmark not defined.	
PERNYATAAN	KEASLIAN
.....	SKRIPSI
.....	Err
or! Bookmark not defined.	
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTARSINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 LATAR BELAKANG.....	1
I.2 RUMUSAN MASALAH.....	2
I.3 TUJUAN PENULISAN.....	2
I.4 MANFAAT PENELITIAN.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II. 1 S-NITROSOGLUTATHIONE.....	4
II. 2 LUKA & PENYEMBUHANNYA.....	7
II. 3 INFEKSI POLIMIKROBIAL.....	15
II. 4 SELF-HEALING HIDROGEL.....	17
II. 5 URAIAN BAKTERI.....	19
II. 6 HEWAN COBA.....	20
II. 7 MONOGRAFI BAHAN.....	22
II. 8 KERANGKA KONSEP.....	25
II. 9 KERANGKA TEORI.....	26
II. 10 HIPOTESIS.....	27
BAB III METODE PENELITIAN	28
III. 1 RANCANGAN PENELITIAN.....	28
III. 2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN.....	28
III. 3 POPULASI & SAMPEL.....	28
III. 4 ALAT DAN BAHAN.....	28
III. 5 VARIABEL PENELITIAN.....	29
III. 6 PROSEDUR KERJA.....	29
III. 7 ETIKA PENELITIAN.....	34
III. 8 ANALISIS DATA.....	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
BAB V PENUTUP	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Fase Penyembuhan Luka	13
2.	Faktor-Faktor Pengaruh Penyembuhan Luka	10
3.	Bakteri Patogen pada Luka Terinfeksi Biofilm	17
4.	Karakteristik Mekanisme Bakteri Biofilm	19
5.	Karakteristik Pembalut Luka Ideal	21
6.	Perbandingan Struktur Kulit Manusia & Mencit	24
7.	Formula PVA-B-KmK/GSNO	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.	Struktur Kimia GSNO	4
2.	Sintesis Endogen NO	5
3.	Uptake Seluler GSNO	6
4.	Reaksi Pathway ONOO	7
5.	Visualisasi Perbedaan Jenis Luka	9
6.	Proses Hemostasis dan Inflamasi	9
7.	Fibroplasia	10
8.	Proses Reepitalisasi	11
9.	Proses Angiogenesis	12
10.	Proses Perbaikan Saraf Perifer	12
11.	Pembentukan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	18
12.	Perbedaan Struktur Kulit	25
13.	Struktur Kimia Karboksimetil Kitosan	25
14.	Struktur Model PVA	26
15.	Struktur Kimia Boraks	26
16.	Sediaan <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KmK/GSNO	39
17.	Pengamatan Makroskopis Luka Kelompok <i>Untreated</i>	40
18.	Pengamatan Makroskopis Luka Kelompok PVA-B-KmK	41
19.	Pengamatan Makroskopis Luka Kelompok PVA-B-KmK/GSNO	41
20.	Grafik Persentase Penyembuhan Luka Tiap Kelompok Perlakuan	42
21.	Gambar 21. Grafik % Wound Closure (Hari 14)	42
22.	Analisis Histologi tiap Kelompok Perlakuan	48
23.	Grafik Hasil pengamatan Aktivitas Antibakteri Kelompok Perlakuan	40
24.	Reaksi Pathway Aktivitas ONOO ⁻	41
25.	Pembentukan Biofilm (48h) & dispersal Biofilm pada Luka Polibakteri	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Evaluasi <i>In Vivo</i>	55
2. Skema Kerja Penyiapan Hewan Coba	56
3. Skema Kerja Pembentukan Biofilm	57
4. Skema Kerja Uji Aktivitas Penyembuhan Luka	58
5. Skema Kerja Pengujian Histologi	59
6. Komposisi Media	60
7. Data CFU Bacterial Burden	61
8. Data Hasil Pengukuran Luas Area Luka	62
9. Analisis Statistik <i>Bacterial burden</i>	64
10. Analisis Statistik Luas Area Luka	67
11. Grafik % Penyembuhan Luka Tiap Kelompok	68
12. Dokumentasi Penelitian	69
13. Surat Persetujuan Kode Etik Penelitian	70
14. Sertifikat Pelatihan Etik Dasar Penelitian	71
15. Daftar Riwayat Hidup	72

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Keterangan
GpIIb-IIIa	<i>Glycoprotein Iib/Iiia</i>
IL-1/6/10	<i>Interleukin-1/6/10</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
M1/2	Makrofag
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
HIF1	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
PDGF-R β	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
NAG	<i>N-Asetilglukosaminidase</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
GSNO	<i>S-Nitrosoglutathione</i>
PVA	<i>Polivinil Alkohol</i>
KmK	<i>Karboksimetil kitosan</i>
PVA-B-KmK/GSNO	Polivinil alkohol boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan melepaskan <i>S-Nitrosoglutathione</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P.areuginosa</i>	<i>Pseudomonas areuginosa</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Penyembuhan luka merupakan suatu proses alami yang secara fisiologis perlu dicapai untuk mengembalikan integritas epitel kulit yang telah rusak dengan terlebih dahulu melalui empat fase penyembuhan berurutan secara tepat dan teratur diantaranya, hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodelling (Guo & DiPietro, 2010). Adanya gangguan saat melewati fase tersebut, secara otomatis akan menunda proses penyembuhan luka secara normal, dan mengarah pada peningkatan kronisitas luka (Demidova-Rice et al., 2012). Luka yang telah kronis biasanya diasosiasikan dengan kondisi seperti luka kaki diabetes, kaki vena, dan luka pasca operasi. Pada kondisi tersebut, luka menjadi sangat rentan terhadap infeksi dan kolonisasi bakteri patogen. Diketahui pada tahun 2006, prevalensi infeksi bakteri patogen dikulit sebesar 24,6% terhadap 1000 orang per tahun, yang mana insidensi ini akan terus meningkat dan terapinya menjadi tantangan kedepan seiring dengan peningkatan faktor patogenitasnya (Hidayati, 2019). Faktor patogenitas ini ialah pertahanan yang dibentuk oleh bakteri yakni biofilm, merupakan suatu zat polimer ekstraseluler produksi sendiri yang akan melindungi satu atau lebih mikroorganisme (bakteri, jamur, atau virus) didalamnya terhadap pengobatan eksternal maupun aktivitas fagositosis sel imun (Clinton & Carter, 2015; Yang et al., 2015; Choi et al., 2020).

Dengan peningkatan faktor patogenitas tersebut, pengobatan antibiotika konvensional tidak lagi mencapai efek terapi yang diharapkan sehingga dibutuhkan pengembangan pengobatan antibakteri melalui pendekatan baru seperti *Nitric oxide* (NO). NO merupakan molekul persinyalan yang diproduksi dan sangat penting bagi tubuh namun lebih jauh, potensi NO diketahui tidak hanya berperan sebagai vasodilatasi, melainkan kini dimanfaatkan secara eksogen karena dapat menginduksi kerusakan sel bakteri/biofilm melalui pembentukan spesies nitrogen reaktif, dan mengganggu sinyal komunikasi antar bakteri (*quorum sensing*) (Barraud et al., 2006). Adapun, lokalisasi NO pada area luka dikulit dapat mempercepat penyembuhan luka khususnya dalam membantu angiogenesis, meningkatkan deposisi kolagen, dan proliferasi sel. Penggunaan NO, bagaimanapun sangat terbatas karena singkatnya waktu paruh dan reaktivitas NO yang cukup tinggi, maka sebagai alternatif digunakan donor NO, yaitu *S-Nitrosoglutathione* (GSNO) dengan karakteristiknya yang lebih biokompatibel, relatif stabil dibanding donor NO lain serta dapat digunakan untuk pelepasan NO langsung pada jaringan target (Fontana & Mutus, 2017; Cisneros et al., 2021). Sumber eksogen NO yakni GSNO yang termasuk kedalam golongan *S-nitrosothiol*, yang secara endogen diproses mejadi antioksidan *glutathione* setelah melepaskan NO (Lee et al., 2020; Corpas et al., 2013; Jahnová et al., 2019; Poh & Rice, 2022). Aktivitas biologis *S-nitrosothiols* mungkin tidak secara khusus ditentukan oleh pelepasan NO karena senyawa kimia ini terbilang kompleks. Namun, *S-Nitrosothiols* telah terbukti membentuk NO, yang pada kondisi sesuai dapat menyebabkan pembentukan oksida nitrogen atau peroxynitrite yang dapat mencegah perkembangan bakteri pada luka (Singh et al., 1996).

Pada kondisi luka tertentu, menutup luka dengan staples dan jahitan ditujukan untuk perlindungan dan penyembuhan luka, namun pada kondisi lain terkadang sulit untuk dicapai sebab dinilai tidak mudah dan efisien dibanding pembaut luka. Pembalut luka dikatakan ideal terutama ketika dapat mengurangi infeksi di area luka, mempertahankan keadaan yang lembab, dapat menyerap cairan luka/eksudat dan memungkinkan permeabilitas oksigen, serta merangsang faktor pertumbuhan untuk mendorong granulasi jaringan. Salah satu pembalut luka yang ideal dan memenuhi kriteria tersebut ialah hidrogel (Carpenter & Schoenfisch, 2012), namun, hidrogel diketahui memiliki sifat mekanik yang buruk dan dapat mengalami deformasi oleh adanya gaya eksternal sehingga dibutuhkan suatu sistem penghantaran baru yang dapat mengatasi kekurangan tersebut dan perlu untuk dikembangkan ialah *Self healing hydrogel*. *Self healing hydrogel* dengan karakteristik dapat memulihkan strukturnya dari kerusakan berguna dalam penyembuhan luka dan perlindungan luka dengan tujuan untuk mencegah cedera sekunder, memperpanjang waktu penggunaannya,

dan memberikan perlindungan tambahan pada area luka dengan mempertahankan bentuknya melalui berbagai mekanisme perbaikan struktur secara otomatis. *Self healing hydrogel* mengombinasikan polimer alami, seperti salah satunya turunan dari polimer kitosan, Karboksimetil kitosan yang memiliki biokompatibilitas dan kelarutan dalam air yang lebih baik serta dikombinasinya dengan suatu polimer sintetik, seperti PVA dengan tujuan mengompensasi sifat kitosan dengan menahan air dalam jumlah besar dan mempertahankan pelepasan obat dari sediaan, selain itu, PVA memiliki karakteristik *Self healing* karena ada ikatan hidrogen yang cukup antara gugus hidroksil bebas pada rantai PVA untuk menjaga keseimbangan kovalen hidrogel itu sendiri. Adapun metode dalam hal ini pembuatan larutan PVA turut melibatkan suatu pengikat silang reversibel berupa boraks sehingga secara praktis dapat memudahkan proses gelasinya (Shahzad Malik et al., 2022; Chopra et al., 2022; Lu et al., 2017).

Dengan beragamnya potensi eksipien tersebut, ditambah aktivitas oleh GSNO tersebut, ditambah urgensi untuk menemukan sediaan yang kiranya dapat dan tepat menangani luka, maka akan dikembangkan GSNO sebagai suatu sediaan pembalut luka hidrogel yang dapat memberikan alternatif pengobatan terhadap patogenitas bakteri ataupun resistensi antibiotik sehingga nantinya diharapkan mampu mencegah pertumbuhan biofilm sekaligus menginisiasi dan memfasilitasi percepatan penyembuhan luka dengan durabilitas sediaan yang baik, namun potensi tersebut, perlu dikonfirmasi melalui suatu uji evaluasi terlebih dahulu, yakni dengan pengaplikasian model dan metode evaluasi *in vivo* yang sesuai, valid dan *reproducible* dalam memprediksi aktivitas sediaan melalui efek biologis pada model organisme kompleks. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas *in vivo* pembalut luka *self-healing hydrogel* Polivinil Alkohol/Boraks yang melepaskan GSNO yang diperkuat Karboksimetil kitosan sehingga nantinya dapat memprediksi aktivitas penyembuhan luka, antibakteri dan antibiofilm pada luka yang terinfeksi polibakteri (*S.aureus*, *P.aeruginosa* dan MRSA).

1.2 RUMUSAN MASALAH

1. Bagaimana aktivitas antibakteri sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo* ?
2. Bagaimana aktivitas antibiofilm sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo* ?
3. Bagaimana aktivitas penyembuhan luka sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo* ?

1.3 TUJUAN PENULISAN

1. Mengetahui aktivitas antibakteri sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo*.
2. Mengetahui aktivitas antibiofilm sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo*.
3. Mengetahui aktivitas penyembuhan luka sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo*.

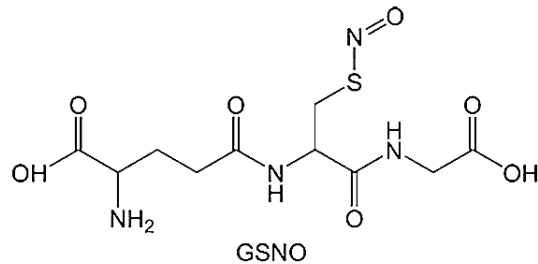
1.4 MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dapat dijadikan sebagai referensi ilmiah bagi mahasiswa dan para peneliti kedepannya terkait aktivitas antibakteri, antibiofilm dan efek penyembuhan luka sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 S-NITROSOGLUTATHIONE

S-Nitrosoglutathione ialah sumber eksogen *Nitric Oxide* (NO) yang termasuk kedalam golongan *S-nitrosothiol* dengan karakteristik berat molekul rendah, tidak beracun dan secara endogen diproses mejadi antioksidan *glutathione* (GSH; -Glu-Cys-Gly) setelah melepaskan NO dalam proses yang disebut S-nitrosilasi (Lee et al., 2020; Corpas et al., 2013; Jahnová et al., 2019; Poh & Rice, 2022). GSNO merupakan perantara penting dalam metabolisme oksida nitrit dan terlibat dalam banyak jalur pensinyalan yang dimediasi NO melalui modifikasi pasca-translasi protein yang peka terhadap reaksi redoks (Yap et al., 2010). GSNO dengan nama lain SNOG, *Nitrosoglutathione*, *Glutathione thionitrite*, *(S)-2-Amino-5-(((R)-1-((carboxymethyl)amino)-3-(nitrosothio)-1-oxopropan-2-yl)amino)-oxopentanoic acid*, *S-Nitroso-L-Glutathione*, diketahui berbentuk padat dengan rumus molekul $C_{10}H_{16}N_4O_7S$ dan berat molekul 336.32 (Pubchem, 2021).

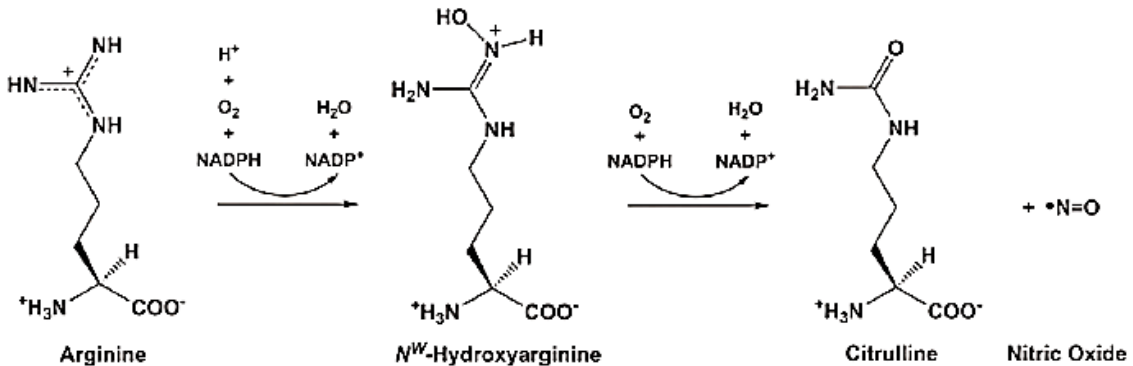


Gambar 1. Struktur *S-Nitrosoglutathione* (Broniowska & Hogg, 2012)

1. Mekanisme Reaksi yang melibatkan GSNO

a. Sintesis NO (In Vivo)

Sintesis NO dikatalisis oleh enzim NOS menggunakan L-arginin sebagai substrat, dengan pengurangan nikotinamida-adenin-dinukleotida fosfat (NADPH) dan oksigen, Flavin mononukleotida (FMN), Flavin adenin dinukleotida (FAD) dan (6R-) 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4) sebagai kofaktor dari semua isozim.



Gambar 2. Sintesis Endogen NO (Yang et al., 2015)

Secara endogen, NO diproduksi dalam dua langkah oleh enzim NOS (Gambar 2). Pertama, NOS menghidroksilasi L-arginin dengan mentransfer elektron dari NADPH ke heme yang terletak di domain oksigenase melalui FAD dan FMN di domain reduktase. Untuk menghasilkan N-hidroksi-L-arginin (NHA), yang mengandung gugus $-C(NH_2)=NOH$ yang sebagian besar tetap mengikat ke enzim. Adapun domain oksigenase mengikat oksigen molekuler kofaktor esensial, BH_4 dan substrat L-arginin. Selanjutnya elektron pada situs heme akan mengaktifkan O_2 dan mengoksidasi NHA, yang menghasilkan ikatan C=N dari NHA dan karenanya diperoleh NO dan *L-sitruilin* (Yang et al., 2015).

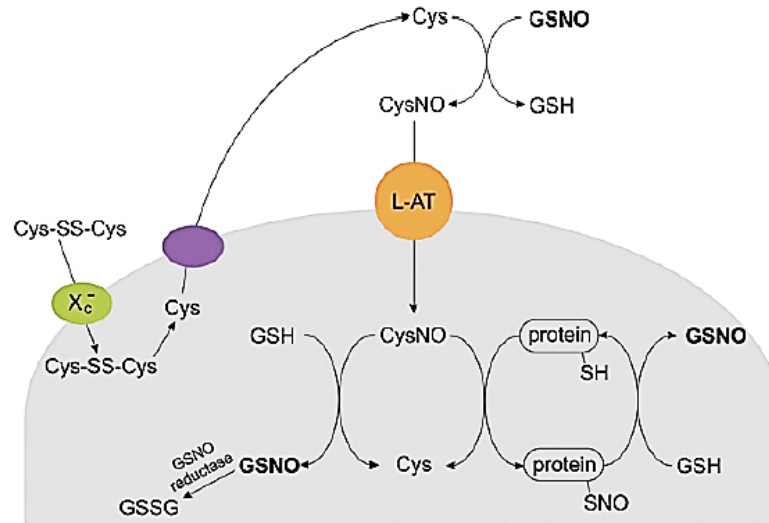
b. Degradasi GSNO Melepaskan NO

Pelepasan NO dari GSNO sangat bergantung pada faktor lingkungan (misalnya, transisi ion logam, cahaya, dll.) (Broniowska et al., 2013). *S-nitrosothiol* sensitif terhadap fotolitik dan juga degradasi transisi ion logam tetapi stabil dengan adanya transisi pengkhelat ion logam dalam gelap (Singh et al., 1996). Secara umum *S-nitrosothiols* terurai oleh pembelahan homolitik ikatan S-N (Reaksi 1).



Proses ini menghasilkan NO dan radikal thyl, RS. Aktivitas biologis *S-nitrosothiols* mungkin tidak secara khusus ditentukan oleh pelepasan NO karena senyawa kimia ini terbilang kompleks. *S-Nitrosothiols* juga telah terbukti membentuk NO^- , yang dalam kondisi sesuai dapat menyebabkan pembentukan oksida nitrogen atau peroxynitrite (Singh et al., 1996). *S-Nitrosothiol* juga dapat mengalami transfer nitrosonium (NO^+) ke tiol seluler lainnya melalui proses yang disebut sebagai transnitrosasi.

c. Respon sel terhadap GSNO



Gambar 3. Uptake Seluler GSNO (Broniowska et al., 2013)

Pengobatan menggunakan GSNO, meskipun tidak langsung dibawa masuk ke dalam sel namun, menyebabkan peningkatan kadar *S-nitrosothiol* seluler dalam banyak kondisi. Awalnya dihipotesiskan bahwa GSNO terurai di ruang ekstraseluler untuk melepaskan NO yang kemudian mampu berdifusi melintasi membran sel ke target protein *S-nitrosat*. Mekanisme utama penyerapan GSNO ke dalam sel membutuhkan transfer gugus nitroso dari GSNO ke tiol lain yang mengandung asam amino, L-sistein, sebelum penyerapan.

Reaksi transnitrosasi ini menghasilkan glutathione dan S-nitrosothiol dengan berat molekul rendah yang baru, S-nitroso-L-sistein (L-CysNO) yang merupakan substrat yang baik untuk penyerapan melalui sistem transporter asam amino L (L-AT). L-CysNO mudah diangkut ke dalam sel dan dapat berupa *glutathione* seluler S-nitrosat untuk mereformasi GSNO di dalam sel atau secara langsung Tiol protein S-nitrosat untuk memperoleh respons seluler. Kehadiran sistin dalam media kultur sel diperlukan untuk metabolisme seluler GSNO. Mekanismenya melibatkan pengambilan sistin seluler melalui xc-transporter yang diikuti oleh reduksi intraseluler dan ekspor sistein. GSNO kemudian mentransnitrosasi sistein yang baru terbentuk ((Broniowska et al., 2013).

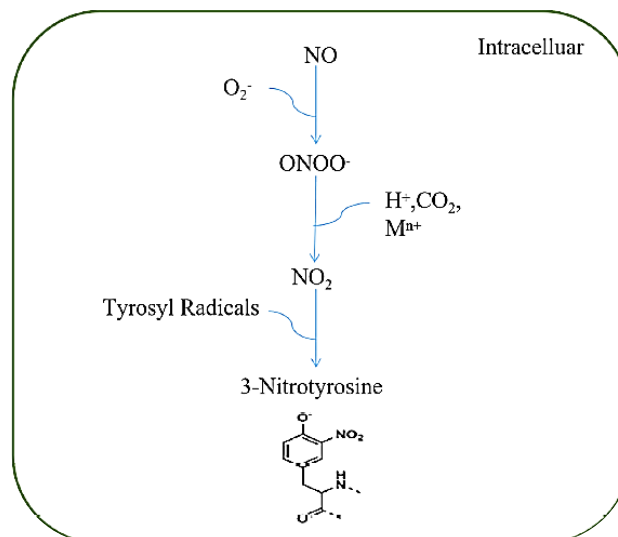
2. Nitrit Oksida beserta Peranannya

Nitrit oksida (NO) merupakan molekul pensinyalan terkecil (jari-jari atom 3-4 Å), yang diproduksi oleh tiga isoform enzim NO sintase (NOS) menggunakan L-arginin dan molekul oksigen sebagai substrat dan membutuhkan kofaktor tereduksi yakni *nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate* (NADPH), *flavin adenine dinucleotide* (FAD), *flavin mononucleotide* (FMN), dan (6R-)5,6,7, 8-*tetrahidrobiopterin* (BH4). Adapun NO bersifat hidrofob, dan sebagai radikal bebas diatomik yang reaktif, hal ini memungkinkan NO untuk bekerja dan melintasi sel dalam berbagai cara (Förstermann & Sessa, 2012; Paricio et al., 2019). NO akan diproduksi secara endogen dengan induksi oleh makrofag teraktivasi, yang mengarah pada Up-regulasi transkripsi iNOS sebagai respons terhadap patogen (Yang et al., 2015). Pada konsentrasi rendah NO bertindak sebagai molekul pensinyalan untuk memulai respon imun, dan pada konsentrasi tinggi, NO mengikat DNA, protein, dan lipid untuk secara langsung menghambat terjadinya infeksi (Paricio et al., 2019).

3. Mekanisme Aktivitas Nitrit Oksida (NO)

a. Mekanisme Anti Mikrobial NO

NO bekerja melalui 2 mekanisme yang berbeda. Yang pertama ialah efek dari reaksi kimia NO dengan oksigen yang menyebabkan pembentukan spesies radikal reaktif (ROS). Interaksi NO dengan (Superoksida O_2^-), membentuk turunan antimikroba reaktif diantaranya peroksinitrit ($ONOO^-$) (Witte et al., 2002). Anion peroksinitrit ($ONOO^-$) yang dihasilkan selama proses ini dapat mennitratkan beberapa biomolekul, seperti protein, lipid, dan DNA, untuk menghasilkan 3-nitrotirosin (3-NT), yang merupakan penginduksi kematian sel (Wang et al., 2021).



Gambar 4. Reaksi Pathway $ONOO^-$ (Wang et. al., 2021).

Turunan ini (Anion peroksinitrit (ONOO^-)) telah dilaporkan mengganggu DNA dengan mengakibatkan deaminasi dan kerusakan oksidatif yang mengandung pemutus untaian *abasic site* (lokasi dalam DNA yang tidak memiliki basa purin maupun pirimidin) dan perubahan DNA lainnya. Adapun interaksi NO_2 dan (OONO^-) dengan protein berbeda sehingga NO menghambat adhesi bakteri dengan menghancurkan protein adhesi membran bakteri dan menginduksi penyebaran bakteri dalam biofilm. Mekanisme yang kedua yaitu karena afinitasnya dengan heme atau logam yang mengandung enzim seperti Fe dalam guani-siklase (Witte et al., 2002). NO dapat menonaktifkan enzim metabolik dengan melepaskan besi dari metaloenzim, sehingga menghambat secara akut metaloprotein dalam reaksi pernapasan bakteri (Yang et al., 2015).

b. Mekanisme Penyembuhan Luka NO

Mekanisme NO secara langsung pada penyembuhan luka belum begitu jelas, namun disebutkan Fontana & Mutus (2017) bahwa NO memiliki peran yang penting dalam hal deposisi kolagen, yang mana ditemukan terjadinya penurunan kolagen pada saat kadar NO di hambat dipusat lokasi luka.

2.2 LUKA & PENYEMBUHANNYA

1. Penyembuhan Luka

Luka didefinisikan sebagai disrupsi/rusaknya integritas epitel yang dapat disertai dengan gangguan struktur dan fungsi jaringan normal di bawahnya. Mulai dari kerusakan sederhana pada integritas epitel kulit hingga lebih dalam, meluas ke jaringan subkutan dengan kerusakan pada struktur lain seperti tendon, otot, pembuluh darah, saraf, organ parenkim bahkan tulang. (Masson-Meyers et al., 2020; Velnar et al., 2009). Proses penyembuhan luka merupakan rangkaian kejadian kompleks sesaat setelah cedera dan berakhir dengan penutupan luka yang lengkap dan penyusunan jaringan parut yang berhasil dan fungsional. Meskipun perbaikan jaringan umumnya digambarkan sebagai serangkaian tahapan, pada kenyataannya itu adalah proses berkelanjutan di mana sel mengalami sejumlah perubahan biologis yang rumit untuk memfasilitasi hemostasis, memerangi infeksi, perpindahan kepusat luka, penyimpanan matriks, pembentukan pembuluh darah baru, dan pengerutan untuk menutupi defek (Sharon Baranoski & Ayello, 2011). Tujuan akhir penyembuhan luka tentunya untuk membentuk jaringan yang memiliki fungsionalitas dan tampilan visual yang mungkin paling mendekati kulit asli dalam jangka waktu yang wajar (Baron et al., 2020).

2. Jenis-Jenis Luka

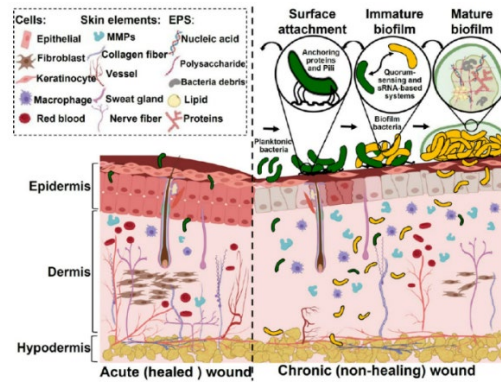
Berdasarkan lama waktu penyembuhannya, Luka dapat diklasifikasikan sebagai luka akut dan kronis.

1) Luka Akut

Luka yang berlangsung pulih secara normal dengan tepat waktu sebagai hasil restorasi fungsional maupun anatomis didefinisi sebagai luka akut. Luka akut dapat berupa luka teriris/tersayat/luka prosedur pembedahan dengan waktu penyembuhan biasanya berkisar antara 5 -10 hari, atau dalam 30 hari. (Velnar et al., 2009).

2) Luka Kronis

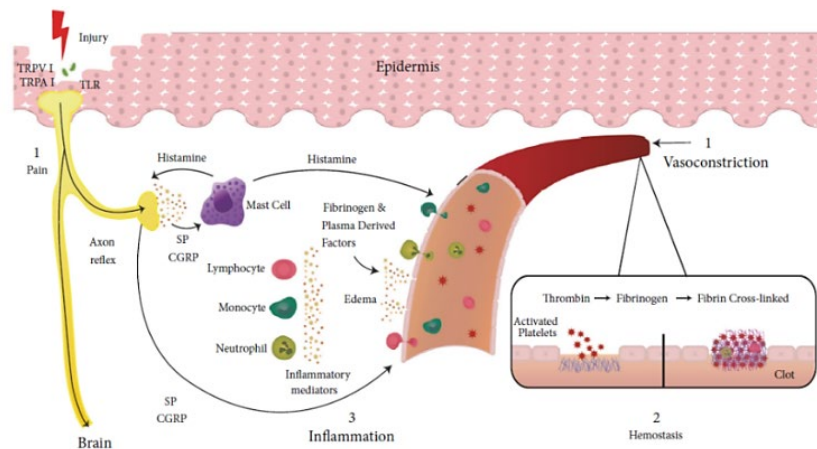
Luka kronis adalah luka yang gagal berkembang melalui tahap penyembuhan normal dan tidak dapat diperbaiki secara teratur dan tepat waktu. Proses penyembuhan tidak lengkap dan terganggu oleh berbagai faktor, yang memperpanjang satu atau lebih tahapan dalam fase hemostasis, inflamasi, proliferasi atau remodeling. Faktor-faktor ini termasuk infeksi, hipoksia jaringan, nekrosis, eksudat, dan kadar sitokin inflamasi yang berlebihan.



Gambar 5. Visualisasi Perbedaan Jenis Luka (Darvishi et al., 2022)

3. Fisiologi Penyembuhan Luka Normal

Penyembuhan luka adalah proses biologis kompleks yang terjadi di semua jaringan di semua organ tubuh. Berbagai jenis sel, termasuk keratinosit, neutrofil, makrofag, limfosit, fibroblas, dan sel endotel, terlibat dalam proses ini. Proses penyembuhan luka terdiri dari empat fase, hemostasis, inflamasi (gambar) proliferasi, dan remodeling.



Gambar 6. Proses Hemostasis & Inflamasi (Dorantes & Ayala, 2019)

a. Fase Hemostasis

Hemostasis merupakan fase awal setelah cedera terjadi. Mulanya perdarahan ke dalam luka mengekspos trombosit ke subendotelium trombogenik. Trombosit berinteraksi dengan reseptor GpIIb-IIIa pada kolagen subendotelium yang rusak untuk menjadi aktif dan membentuk koagulan (Gonzalez et al., 2016). Trombosit yang teraktivasi melepaskan granulanya dan memicu kaskade koagulasi ekstrinsik dan intrinsik. Polimerisasi jaringan fibrin membantu membentuk gumpalan dan berfungsi sebagai perancah untuk infiltrasi sel (leukosit, keratinosit, dan fibroblas) yang membentuk penghalang terhadap invasi mikroorganisme, mengatur matriks sementara yang diperlukan untuk migrasi sel, yang pada gilirannya mengembalikan fungsi kulit sebagai barrier pelindung dan penjaga integritas kulit. (Gonzalez et al., 2016 ; Gantwerker & Hom, 2011).

b. Fase Inflamasi

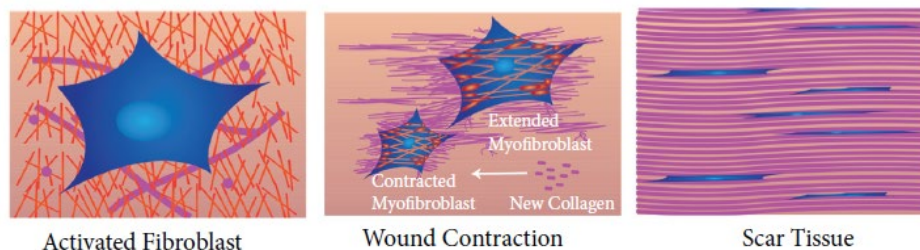
Fase inflamasi ditandai dengan masuknya neutrofil, makrofag, dan limfosit kelokasi cedera. Neutrofil ialah leukosit pertama tiba di lokasi, secara massal di dalam 24 jam pertama. Neutrofil segera diikuti oleh makrofag, yang tertarik oleh produk sampingan dari apoptosis neutrofil. Sel fagosit seperti makrofag dan limfosit lainnya muncul di luka untuk mulai membersihkan debris dan bakteri dari luka. Makrofag ini menyusup sekitar 48 jam pasca cedera. Fase penyembuhan ini penting untuk memerangi infeksi. Jika terganggu atau berkepanjangan (yaitu, lebih dari 3 minggu), peradangan ini dapat menyebabkan luka kronis, gangguan penyembuhan, dan akhirnya lebih banyak jaringan parut. Faktor penting yang secara abnormal dapat memperpanjang fase penyembuhan ini termasuk jumlah bakteri yang tinggi (mikroorganisme lebih dari $10^5/g$ jaringan), trauma berulang, dan benda asing yang menetap di dalam luka. Setelah luka telah didebridement, fase perbaikan atau proliferasi dimulai (Gantwerker & Hom, 2011).

c. Fase Proliferasi

Fase proliferasi diidentifikasi oleh fibroplasia, termasuk proliferasi dan diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, deposisi matriks ekstraseluler, dan kontraksi luka, reepitelisasi dan interaksi epitel-mesenkim antara keratinosit dan fibroblas, angiogenesis, termasuk proliferasi sel endotel dan pembentukan pembuluh darah baru, dan perbaikan saraf perifer, yang terdiri dari reinervasi kolateral dan saraf regenerasi. Makrofag adalah sel inflamasi dominan yang mengatur fase proliferasi perbaikan luka kulit (Dorantes & Ayala, 2019).

1. Fibroplasia

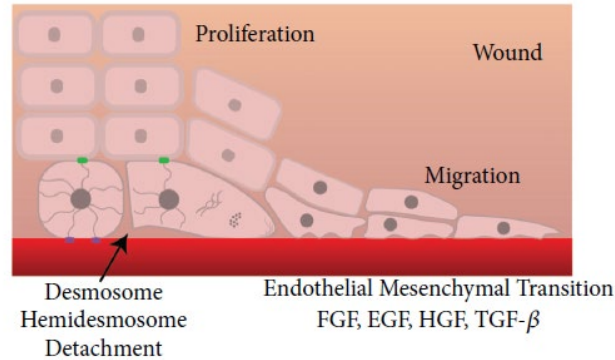
Fibroblas adalah sekelompok sel dengan plastisitas tinggi dan peran yang berbeda dalam lapisan kulit yang berbeda. Fibroblas matang bermigrasi ke jaringan granulasi, memulai sintesis kolagen, menggantikan matriks sementara fibrin, dan berdiferensiasi menjadi miofibroblas, meningkatkan deposisi kolagen dan memulai kontraksi luka.



Gambar 7. Fibroplasia (Dorantes & Ayala, 2019)

2. Reepitalisasi

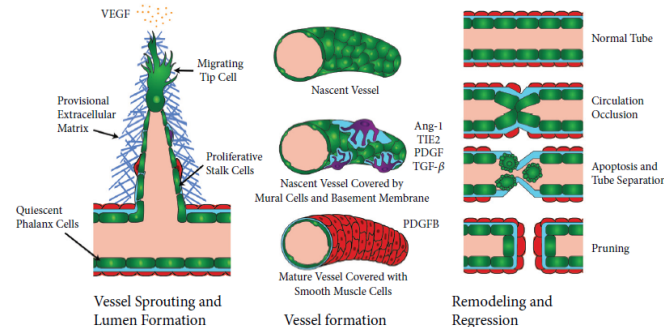
Reepitelisasi dimulai 16-24 jam setelah cedera dan berlanjut sampai fase remodeling perbaikan luka. Awal setelah cedera, keratinosit berdiferensiasi dan bermigrasi antara bekuan fibrin dan dermis kolagen yang kaya sementara keratinosit suprabasal yang terletak di belakang ujung depan berproliferasi untuk menyediakan lebih banyak sel untuk mengisi celah. Keratinosit suprabasal yang dekat dengan ujung depan berubah bentuk dan bermigrasi di atas keratinosit basal, menjadi sel depan. Pada tahap akhir reepitelisasi, sel-sel berdiferensiasi menjadi sel epitel yang tetap melekat erat ke membran basal. Interaksi sel-sel dan sel-ECM, faktor pertumbuhan, dan sitokin yang dilepaskan oleh berbagai jenis sel merangsang keratinosit untuk bermigrasi di atas matriks sementara untuk menutupi luka, sementara keratinosit di tepi luka mulai berproliferasi dan mengikuti bagian depan yang bermigrasi. kemudian, fibroblas berdiferensiasi menjadi miofibroblas, meningkatkan deposisi kolagen dan memulai kontraksi luka.



Gambar 8. Proses Reepitalisasi (Dorantes & Ayala, 2019)

3. Angiogenesis

Selama fase proliferasi, fenotip antiinflamasi makrofag (M2) muncul sebagai populasi seluler yang dominan, mengatur interaksi dengan sel endotel, fibroblas, keratinosit, matriks ekstraseluler (ECM), dan saraf perifer. Berkurangnya suplai darah dan metabolisme sel yang bekerja dipercepat untuk memperbaiki penyebab cedera jaringan luka menjadi hipoksia, stimulus utama untuk angiogenesis. Kondisi hipoksia merangsang sintesis hypoxia inducible factor-1 (HIF1) dalam makrofag, fibroblas, sel endotel vaskular, dan keratinosit. Pelepasan faktor proangiogenik seperti VEGF, VEGFA, FGF2, PDGF, TGF- β 1, dan metabolisme pergantian sel endotel memulai neovaskularisasi. Tiga jenis sel endotel berada di pusat angiogenesis: sel ujung yang sangat bermigrasi yang memandu tunas baru yang tumbuh, sel tangkai proliferaatif yang memanjangkan pembuluh baru, dan sel falanx diam yang membentuk lapisan pembuluh darah. Diferensiasi sel endotel ke dalam setiap subtype terutama dipandu oleh peningkatan kehadiran VEGF dan makrofag.

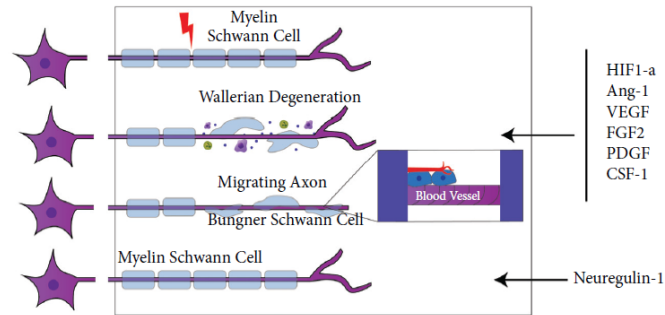


Gambar 9. Proses Angiogenesis (Dorantes & Ayala, 2019)

Struktur sel endotel yang belum matang beranastomosis dengan pembuluh darah lain yang sudah ada sebelumnya, fusi yang difasilitasi oleh makrofag. Struktur ini memperoleh lumen, membran basal baru, dan sel endotel melepaskan perisit perekrutan PDGF, yang mengekspresikan reseptor (PDGF-R β) dan menutupi pembuluh darah baru dengan sel-sel ini, membentuk pembuluh darah baru yang stabil. Akhirnya, fibroblas menyintesis dan menyimpan matriks ekstraseluler baru yang dapat membentuk jaringan granulasi

4. Perbaikan Saraf Perifer

Setelah cedera, saraf terputus mempengaruhi fungsi homeostatik kulit. Pemulihan fungsi neurologis setelah saraf perifer traumatis cedera melibatkan dua proses: reinervasi kolateral dan regenerasi saraf. Denervasi kulit merangsang kolateral tumbuhnya aferen kulit nosiseptif dari dekat tidak rusak akson untuk mempersarafi kembali kulit.



Gambar 10. Proses perbaikan saraf perifer (Dorantes & Ayala, 2019)

Pada orang dewasa, sistem saraf perifer (PNS) mampu beregenerasi fungsi saraf setelah cedera, dengan menumbuhkan kembali ujung dua tunggul saraf bermielin dan menghubungkan kembali saraf yang terluka. Monosit-makrofag, sel Schwann (SC), fibroblas, sitokin inflamasi, faktor transkripsi, komplemen, dan metabolit asam arakidonat berpartisipasi dalam proses ini. SC menyimpan plastisitas yang cukup besar, dan setelahnya cedera, selubung mielinnya dibuang dan SC terdiferensiasi ke sel seperti nenek moyang untuk mendorong pertumbuhan kembali aksonal. SC keluar dari tunggul saraf dan berinteraksi dengan fibroblast terakumulasi di lokasi cedera. Ephrin-B yang ada dalam fibroblas menghubungi reseptor EphB2 SC dan pensinyalan ini mendorong gerakan terarah mereka. Secara bersamaan, dediferensiasi SC menginduksi pelepasan monosit chemoattractant protein-1 (MCP-1), $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, dan pankreatitis terkait protein III (PAP-III), yang merekrut monosit/makrofag yang bersirkulasi ke tempat cedera, di mana sel-sel ini melepaskan faktor tambahan, sehingga meningkatkan perekrutan monosit/makrofag lebih lanjut. Makrofag merasakan lingkungan hipoksia dengan melepaskan pertumbuhan endotel vascular faktor (VEGF) dan faktor pertumbuhan hipoksia (HIF) yang mempromosikan angiogenesis (Dorantes & Ayala, 2019).

d. Fase Remodeling

Pada fase terakhir penyembuhan luka ini, jaringan granulasi mengalami proses penurunan bertahap. Epidermis, pembuluh darah dermal, saraf, dan renovasi otot rangka, membentuk jaringan fungsional. Komponen vaskular fibroblas dan miofibroblas jaringan granulasi menurun dan sel PBMC mengalami apoptosis. Demikian pula, jumlah proteoglikan dan glikosaminoglikan yang menyediakan struktur dan peran hidrasi berkurang. kolagen metalloproteinase dilepaskan oleh fibroblas dan makrofag mendegradasi kolagen Tipe III dari jaringan granulasi dan menggantinya dengan kolagen Tipe I, yang selanjutnya direorganisasi menjadi fibril paralel, membentuk bekas luka selularitas. Fase terakhir ini bisa tahan berbulan-bulan. Fibrosis berlebih pada tahap ini menyebabkan jaringan parut hipertrofik (dengan bekas luka terbatas pada area luka) atau pembentukan keloid (dengan bekas luka memanjang di luar tepi luka). Adapun garis besar yang terlibat dalam fase penyembuhan luka, dirangkum pada tabel 1.

Tabel 1. Fase Penyembuhan Luka (Baranoski & Elizabeth A. Ayello, 2012)

Fase Penyembuhan Luka	
Homeostasis	
Platelet	Melepas Sitokin (PDGF, TGF- β)
Fase Inflamasi	
Debris Jaringan & Patogen	Menarik makrofag & neutrophil yg bertanggung jawab : <ul style="list-style-type: none"> • Fagositosis • Produksi regulator biologis, lipid bioaktif, dan enzim proteolitik
Fase Proliferasi	
Fibroblast	Bertanggungjawab pada : <ul style="list-style-type: none"> • Sintesis & deposisi protein ekstraseluler • Produksi Growth factor • Produksi factor angiogenik
Matriks Ekstraselular (ECM) dan jaringan granulasi	ECM terdiri dari : <ul style="list-style-type: none"> • Kolagen dan elastin • Adhesive protein • Fibronectin & lamina • Polisakarida • Proteoglycans • glicosaminoglycans
Angiogenesis	Pertumbuhan kapiler menuju ECM
Reepitalisasi	Migrasi sel basal marginal melintasi matriks sementara
Kontraksi Luka	Kontraksi fibroblas dan miofibroblas untuk mendekatkan tepi luka
Fase Remodeling	
Bekas luka	Pembentukan jaringan parut, massa kolagen avaskular dan aseluler

4. Patofisiologi Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka ialah suatu proses fisiologis tubuh untuk mempertahankan homeostasis dengan melibatkan interaksi dari berbagai sel. Namun ketidakseimbangan interaksi tersebut mengakibatkan terjadinya gangguan dalam mekanisme penyembuhan, sehingga dapat memperpanjang/menunda penyembuhan luka. Adapun berbagai hal yang memperlambat dalam penyembuhan luka yaitu sebagai berikut :

- 1) Overekspresi Sitokin : Mengganggu proliferasi sel, ↓ECM.

Kondisi inflamasi kronis menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan mediator pro/anti -inflamasi, yang diperparah oleh perekrutan neutrofil dan makrofag ke wilayah tersebut, alhasil terjadi overekspresi sitokin inflamasi. Akibatnya, terjadi peningkatan rekrutmen leukosit ke wilayah tersebut dan pelepasan spesies oksigen reaktif (ROS) oleh sel inflamasi. Kelebihan produksi ROS menimbulkan kerusakan sel, mengganggu proliferasi /diferensiasi keratinosit dan fibroblas di daerah luka dan untuk apoptosis sel. Selanjutnya, ROS

menyebabkan degradasi faktor pertumbuhan terlibat dalam mekanisme penyembuhan, mengurangi kuantitas dan bioavailabilitas molekul. Selain itu, peningkatan sitokin pro-inflamasi mempengaruhi mekanisme penyembuhan luka selanjutnya, meningkatkan MMP dan protease lain yang mengganggu proliferasi/migrasi sel dan menurunkan akumulasi dan remodeling komponen matriks ekstraseluler (ECM) (Gushiken et al., 2021)

2) Ketidakseimbangan faktor pro/anti angiogenik

Dalam fisiologis penyembuhan luka, ada keseimbangan antara proliferasi/aktivasi dan pematangan/apoptosis pembuluh darah selama fase proliferasi penyembuhan. Namun, ketidakseimbangan antara faktor pro- dan anti-angiogenik mendorong penurunan neovaskularisasi dan aliran darah di daerah tersebut, sehingga akan menunda mekanisme dari fase proliferasi dan remodeling (Gushiken et al., 2021).

3) Overekspresi β -catenin/jalur c-myc : Hiperproliferasi keratinosit

Keterlambatan dalam reepitelisasi merupakan kesalahan lain yang dapat terjadi dalam penyembuhan luka. Sebagai konsekuensi inflamasi kronis dan vaskularisasi berkurang, keratinosit dari tepi luka patologis memperoleh keadaan hiperproliferasi karena ekspresi berlebih dari jalur β -catenin/c-myc. Selain itu, keratinosit ini berbeda dari keratinosit luka normal karena mereka hiperkeratosis dan parakeratosis dan mengekspresikan kadar keratin 1, 2 dan 10 yang rendah. Selain itu, potensi migrasi keratinosit dalam penyembuhan abnormal terganggu. Mekanisme molekuler dari potensi migrasi keratinosit yang buruk ini terkait dengan degradasi proteolitik faktor pertumbuhan dan protein matriks ekstraseluler yang diperlukan untuk migrasi, serta penurunan ekspresi laminin 3A32, prekursor laminin 5 yang terkait dengan migrasi keratinosit (Gushiken et al., 2021).

5. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Beberapa faktor dapat menyebabkan gangguan dalam penyembuhan luka. Secara umum Guo & DiPietro (2010) menguraikan faktor-faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka dapat dikategorikan menjadi lokal dan sistemik (tabel 2.2). Faktor lokal merupakan faktor yang secara langsung dapat mempengaruhi karakteristik dari luka itu sendiri, sedangkan faktor sistemik ialah kondisi kesehatan keseluruhan (ada atau tidaknya penyakit penyerta) yang mempengaruhi kemampuannya untuk melakukan penyembuhan. Banyak dari faktor-faktor ini terkait, dan faktor sistemik bertindak melalui efek lokal yang mempengaruhi penyembuhan luka.

Tabel 2. Faktor-faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka (Guo & DiPietro, 2010)

Faktor Lokal	Faktor Sistemik
Infeksi	Usia dan Jenis kelamin
Oksigenasi	Hormone seks
Insufisiensi Vena	Stress
<i>Foreign Body</i>	Iskemia
	Penyakit (Diabetes, Keloid, Fibrosis, Gangguan penyembuhan keturunan, penyakit kuning, uremia, kegemukan)
	Obat-obatan (Steroid glukokortikoid, obat antiinflamasi nonsteroid, kemoterapi)

Faktor Lokal	Faktor Sistemik
	Alkoholisme dan merokok
	Kondisi immunocompromised (Kanker, Terapi radiasi, AIDS)
	Nutrisi

6. Model Evaluasi Penyembuhan Luka

a. Model Luka Insisi

Model luka insisi merupakan model luka yang berupa sayatan dengan karakteristik panjang luka berkisar dari 10 – 15 mm, *full-thickness*, dan luka dapat diperoleh dengan alat scalpel. Model luka ini ialah model kedua paling banyak digunakan dalam studi ilmiah sebagai contoh, studi untuk melihat penyembuhan luka intensi primer pada evaluasi sifat mekanik kekuatan tekanan luka insisi punggung tikus yang memungkinkan pengukuran kekuatan tarik dengan tensiometri (Ansell et al., 2014). Adapun model luka insisi kurang cocok untuk evaluasi histologis dan biokimia jaringan luka (epitelisasi) karena terbatasnya volume aktivitas penyembuhan luka. (Masson-Meyers et al., 2020).

b. Model Luka Eksisi

Model luka eksisi ialah salah satu model penyembuhan luka yang paling umum digunakan dan dianggap menyerupai luka klinis akut yang memerlukan penyembuhan intensi sekunder, yang mana tepi kulit tidak dijahit bersama. Adapun luka dihasilkan melalui operasi pengangkatan semua lapisan kulit (epidermis, dermis dan lemak subkutan) dari hewan coba (mencit, tikus, babi, kelinci) menggunakan biopsi punch, gunting bedah, ataupun laser dengan ukuran (diameter) luka dapat dimulai dari 2-20 mm (Ansell et al., 2014). Teknik ini melibatkan pembuatan luka *full-thickness* yang memanjang melalui panniculus carnosus pada dorsum tikus, diikuti penempatan bidai silikon di tengah dan difiksasi ke kulit untuk mencegah kontraksi luka, dengan harapan luka akan sembuh melalui pembentukan jaringan granulasi dan reepitelisasi, mirip dengan proses pada manusia.

c. Model Luka Bakar

Model penyembuhan luka bakar dapat dihasilkan dengan melepuhkan kulit atau oleh kerusakan termal. Pada model pertama, lepuh dibuat dengan memaparkan air panas area tertentu pada kulit, kedua terdiri dari aplikasi panas langsung ke kulit dengan pelat logam panas. Pada model kedua, lepuh dapat dihilangkan atas luka untuk mengekspos dermis dan meninggalkan luka terbuka.

d. Model Luka *Impaired*

Model luka ini dapat dihasilkan dengan model luka diabetes, malnutrisi, dan sindrom metabolik.

7. Metode Evaluasi Penyembuhan Luka

Adapun metode evaluasi untuk mengamati penyembuhan luka diantaranya, analisis laju penyembuhan Luka, analisis luka menggunakan foto, menggunakan *software*, penilaian biofisika, pengujian histopatologi, pengujian *Immunohistochemistry*, *Enzyme -Linked Immunosorbent Assay*, pengujian biokimia, pengujian hydroxyproline, pengujian *myeloperoxidase*, pengujian N-acetylglucosaminidase, pengujian stress oksidatif, pengujian Flow cytometry, pengujian polarisasi makrofag.

2.3 INFEKSI POLIMIKROBIAL

1. Biofilm

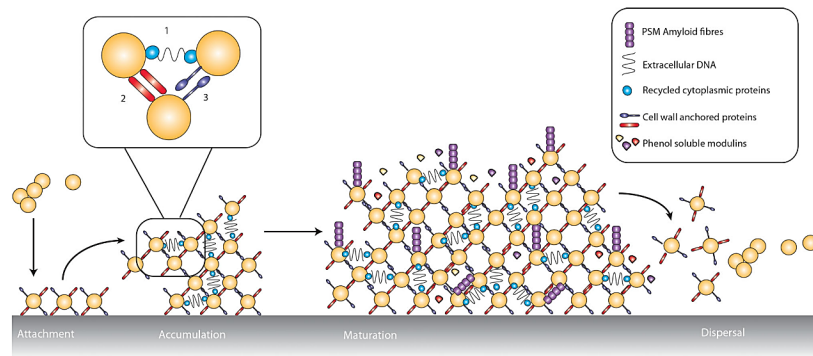
Mikroorganisme yang mengolonisasi jaringan rusak sering membentuk komunitas polimikrobal yang disebut biofilm. Biofilm didefinisikan sebagai kumpulan satu atau lebih mikroorganisme (bakteri, jamur, atau virus) yang melekat pada permukaan, terbungkus dan dilindungi oleh “produksi sendiri” zat polimer ekstraseluler, yang akan menurunkan kerentanannya terhadap agen antimikroba dan respon imun tubuh. Biofilm dapat terbentuk pada jaringan luka yang terpapar bakteri dalam waktu 8 jam dan dapat menjadi infeksi dengan luka yang dalam dan lebih sulit untuk diobati. Adapun matriks yang diproduksi oleh beberapa spesies mikroba biofilm terutama bakteri diantaranya mengandung exopolisakarida, lipid, DNA ekstraseluler (eDNA) dan protein ekstraseluler yang menunjukkan karakteristik seperti amiloid (Darvishi et al., 2022; Hopley et al., 2015; Bertesteanu et al., 2014). Matrix inilah yang memungkinkan keberhasilan komunitas spesies biofilm dalam pertahanan dan perkembangbiakan dilingkungan sel. Selain itu, pembentukan biofilm merusak respon kekebalan tubuh dengan memblokir akses neutrofil ke lokasi luka, menunda reepitelisasi, dan menghambat perkembangan jaringan granular. “Mekanisme pertahanan” oleh bakteri ini, secara akumulatif akan menyebabkan penundaan yang signifikan dalam proses penyembuhan luka (Baron et al., 2020). Luka dermal dikolonisasi oleh bakteri aerobik dan anaerobik dan strain jamur, kebanyakan dari mereka mikrobiota residen dari kulit sekitarnya, rongga mulut dan usus, atau dari lingkungan eksternal. Dianggap bahwa patogen aerobik atau fakultatif seperti *Staphylococcus aureus*, *staphylococci* koagulase-negatif, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp, streptokokus beta-hemolitik, serta *Candida* spp. merupakan penyebab utama keterlambatan penyembuhan dan infeksi baik pada luka akut maupun kronis. Bakteri yang paling umum dalam menginfeksi luka biofilm dan penyakit yang terkait dapat dilihat pada (tabel 3.)

Tabel 3. Bakteri Patogen pada luka terinfeksi biofilmz (Darvishi et al., 2022).

Mikroorganisme	Gram (-/+)	Penyakit yang diasosiasi
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Infeksi kulit dan jaringan lunak, abses (bisul), osteomielitis, infeksi alat kesehatan, rinosinusitis kronis
<i>Pseudomonas aerugi-nosa</i>	-	Infeksi luka kronis, terutama pada luka bakar, infeksi saluran pernafasan, infeksi saluran kemih, dermatitis, infeksi jaringan lunak, bakteremia, infeksi tulang dan sendi, infeksi saluran cerna
<i>Coagulase-negative Staphylococcus</i>	-	Infeksi Saluran Kemih, abses payudara, infeksi kulit dan jaringan lunak seperti selulitis, furunkulosis, dan endokarditis katup asli
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Infeksi luka kronis, infeksi saluran kemih, karies, endokarditis, dan bakteremia
<i>Proteus species</i>	-	Infeksi luka, infeksi luka bakar, infeksi saluran pernapasan, dan bakteremia

Keberadaan biofilm pada luka kronis terdiri dari beberapa kelompok bakteri, umumnya dengan genotipe yang berbeda. Misalnya, pada ulkus vena kaki kronis mengandung *S. aureus* (93,5%), *Enterococcus faecalis* (71,7%), *P. aeruginosa* (52,2%), *Staphylococci* negatif koagulase (45,7%), spesies *Proteus* (41,3%), dan bakteri anaerob (39,1%) (Darvishi et al., 2022). Salah satu mikroorganisme patogen

yang menjadi penyebab paling utama terbentuknya infeksi biofilm ialah *Staphylococcus Aureus*, Adapun pembentukannya dapat diamati pada (gambar 11). Pembentukan diawali dengan produksi adhesi interseluler polisakarida (PIA)/poli-N-asetilglukosamin (PNAG) yang dikodekan/disintesis oleh operon ica (A-B-C-D) menghasilkan PIA (glikan-1,6-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl) dengan muatan positif yang akan mendorong agregasi antar sel dan perlekatan sel ke permukaan inert (McCarthy et al., 2015). Perlekatan *S. aureus* ke permukaan dimediasi oleh suatu protein *cell wall anchored* (CWA). Interaksi sel ke sel terjadi selama fase akumulasi dan dapat dimediasi oleh beberapa faktor. Pada gambar yang diperbesar, menunjukkan bahwa (1) ekstraseluler DNA (eDNA) menghubungkan protein sitoplasmik daur ulang (2) protein CWA mengikat permukaan sel yang berdekatan (3) terjadi Interaksi homofilik antara protein CWA. PSM membentuk serat seperti amiloid yang terlihat di permukaan biofilm dan berperan dalam pembentukan saluran dalam biofilm untuk memungkinkan akses nutrisi, sementara sifat surfaktan PSM akan membantu saat fase penyebaran (Hobley et al., 2015).



Gambar 11. Pembentukan Biofilm Staphylococcus Aureus (Hobley et al., 2015)

2. Patofisiologi

Hilangnya integritas kulit menyebabkan paparan jaringan subkutan menjadi sangat rentan terhadap kolonisasi dan proliferasi mikroba, apalagi diikuti dengan kelembaban, suhu, dan kondisi nutrisi yang sesuai. Infeksi dan kolonisasi mikroba merupakan faktor ekstrinsik yang menyebabkan keterlambatan penyembuhan luka dan berkontribusi terhadap kronisitas luka. Pertumbuhan bakteri hidup yang jumlahnya lebih dari 10^5 atau sejumlah streptokokus A-hemolitik akan sangat virulens pada host, lebih lanjut toksin bakteri akan menginduksi respon inflamasi yang berlebihan. Selanjutnya, sel-sel inflamasi yang direkrut menghasilkan sejumlah protease (termasuk MMP), yang akan menurunkan ECM dan faktor pertumbuhan dalam dasar luka (Demidova-Rice et al., 2012). Bakteri yang menginfeksi luka kronis akan membentuk biofilm dan sangat lazim ditemui pada luka kronis, seperti luka kaki diabetik, tekanan, dan luka vena kaki, yang sering dibentuk oleh komunitas polimikroba yang beragam, termasuk bakteri anaerobik dan aerobik. Adapun aktivitas atau kemampuan bakteri biofilm dalam mempertahankan kehidupannya pada lingkungan host dan lebih lanjut akan semakin berbahaya dan sulit untuk ditangani, lebih detail dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik Kemampuan (Aktivitas) Bakteri Biofilm (Seth et al., 2012)

Karakteristik Kemampuan (Aktivitas) Bakteri Biofilm		
Virulensi	Pertahanan	Persisten
Pensinyalan sel-sel (<i>Quorum-sensing</i>) antara bakteri dalam biofilm	Matriks EPS yang bertindak sebagai barrier terhadap sel inflamasi Host	Perubahan ekspresi gen bakteri dan transfer materi genetik antar sel bakteri
Penghambatan penyembuhan luka, "yg potensial" melalui penghambatan langsung migrasi keratinosit	Penghambatan aktivasi komplemen dan mekanisme pertahanan lain host yang mengarah pada respons inflamasi yang tidak efektif	Penurunan laju pertumbuhan, mengarah pd berkurangnya kemanjuran antibiotik
Faktor virulensi spesifik spesies yang tidak terpisahkan dengan pengembangan dan pemeliharaan biofilm	Blokade dan inaktivasi antibiotik dan terapi lainnya	Pelepasan bakteri planktonik untuk menyebarkan dan mengembangkan biofilm di lokasi baru
		Sel 'Persisten' yg berbeda scr fenotip mengisi kembali sel-sel matriks biofilm

2. 4 SELF-HEALING HIDROGEL

1. Definisi *Self-healing* Hidrogel

Self-healing hidrogel merupakan hidrogel yang mampu memulihkan struktur dan mengembalikan fungsinya (setelah mengalami kerusakan fisik) baik secara otonom maupun dengan mengandalkan rangsangan eksternal (Fan et al., 2020). *Self-healing* awalnya dikembangkan terinspirasi oleh bagaimana proses penyembuhan luka itu terjadi, yang mana merupakan suatu proses alami yang akan ditempuh sistem biologis untuk mengembalikan disrupsi/kerusakan dan menjadi pulih/mendekati fungsi dan tampilan sebagaimana awalnya diciptakan berbekal (tubuh & mekanismenya). Tingkat kemampuan *self-healing* bergantung pada jumlah tautan dan kekuatan muatan bahan penyusunnya. Ini penting dalam desain polimer tergantung pada aplikasi yang dimaksudkan. Seperti, polimer ikatan silang fisik dengan interaksi yang lebih lemah secara inheren akan lebih lemah dibandingkan dengan jaringan ikatan silang kovalen (Shahzad Malik et al., 2022).

2. Mekanisme *Self Healing*

Berikut ialah tipe *self-healing* berdasarkan bagaimana mekanisme/proses *self-healing* yang dialami bahan penyusunannya, dibedakan menjadi *self-healing* ekstrinsik dan intrinsik.

a. Self Healing Intrinsik

Self-healing intrinsic merupakan tipe self healing yang material nya dapat memicu sendiri pemulihan materi setelah retakan atau kerusakan terjadi. Mekanisme pemulihan intrinsik umumnya didasarkan pada ikatan kimia kovalen dinamis dan interaksi fisik non kovalen.

1. Ikatan kovalen Dinamis

Kemampuan ikatan kovalen dinamis dalam menghubungkan material tanpa adanya stimuli fisik, menjadi pembeda yang unik dengan kovalen standar. (Talebian et al., 2019). Ikatan kovalen dinamis dibedakan menjadi beberapa ikatan, yaitu ikatan Imin, Disulfida, Diels-Alder (DA), Kompleksasi Borat-Diol, dan ikatan Acylhydrazone.

2. Interaksi Non Kovalen Fisik

Self-Healing Hidrogel yang di formulasi dengan ikatan silang nonkovalen diantaranya meliputi ikatan hidrogen, ion, hidrofobik, Host-guest dan ikatan ionik.

b. Self Healing Ekstrinsik

Pada tipe ini, bahan *self-healing* Ekstrinsik tidak dapat memperbaiki retakan atau kerusakan dengan sendirinya, sebagaimana seperti saat kondisinya dibentuk (jaringan tiga dimensi) bukan di suhu ruang atau kondisi atmosfer biasa. Dengan demikian, diperlukan suatu stimulus eksternal dalam proses perbaikannya, yang menyediakan energi tambahan untuk mengekspos kelompok terkait dan menyediakan bahan dengan kemampuan *self-healing* (Tu et al., 2019). Contoh khas untuk bahan ini adalah beberapa polimer tanpa gugus aktif yang dapat membentuk ikatan kovalen atau menghasilkan interaksi nonkovalen secara otomatis.

3. Matriks Penyusun dasar *Self-healing*

Bahan self-healing yang ideal seharusnya dapat secara otomatis, tanpa adanya tindakan eksternal memulihkan karakteristik dan integritasnya dalam jumlah waktu minimum setelah mengalami kerusakan dan mengulanginya berkali-kali. (Joy et al., 2020). Berdasarkan jenis molekul pembentuknya, polimer self-healing hydrogel dibedakan menjadi polimer alami dan sintetik.

- Polimer Alami

Polimer alami telah banyak dan secara luas digunakan karena karakteristiknya yang biokompatibel terhadap tubuh/jaringan host, namun dengan keterbatasan yang dimiliki seperti kekuatan mekanik yang relatif lemah, kesulitan dalam mereproduksi formulasi dan pemuatan obat yang akurat, serta adanya potensi risiko imunogenik (Zhang & Huang, 2021). Polimer alami yang termasuk ialah kitosan, selulosa, alginate, agarose, hyaluronic acid, dll.

- Polimer Sintetik

Polimer sintesis adalah polimer buatan yang diturunkan dari polimerisasi monomer. Hidrogel dapat terbuat dari sintesis polimer seperti poli(etilen glikol) (PEG), poli(vinil alkohol) (PVA) dan Poly(acrylic acid/amide). Polimer sintesis memiliki kapasitas daya serap air yang tinggi, struktur terdefinisi dengan baik, berbagai sumber bahan kimia, dan cerdas pada stimuli yang berbeda (Zhang & Huang, 2021). *Wound dressing* yang ideal diharapkan memiliki karakteristik sebagai berikut :

Tabel 5. Karakteristik Pembalut Luka Ideal (Matica et al., 2019)

Karakteristik	Fungsi dalam penyembuhan luka
Menyediakan lingkungan yg lembab	<ul style="list-style-type: none"> - Mencegah dehidrasi dan kematian sel - Mempromosikan migrasi epidermal dan angiogenesis - Menjaga kelembapan di dasar luka
Mencegah Infeksi	<ul style="list-style-type: none"> - Infeksi mikroba menunda proses penyembuhan luka dengan memperpanjang fase inflamasi dan dengan menghambat migrasi epidermal dan sintesis kolagen.
Menyerap Eksudat	<ul style="list-style-type: none"> - Eksudat sangat penting untuk proses penyembuhan luka, tetapi eksudat yang berlebihan dapat menyebabkan maserasi jaringan yang sehat, yang mengakibatkan luka kronis.
Memungkinkan pertukaran gas	<ul style="list-style-type: none"> - Oksigenasi mengontrol kadar eksudat dan merangsang epitelisasi dan fibroblas.
Mudah & tidak sakit saat dilepas	<ul style="list-style-type: none"> - Penghapusan balutan yang melekat dapat menyakitkan dan dapat menyebabkan kerusakan lebih lanjut pada jaringan granulasi.
Harga terjangkau	<ul style="list-style-type: none"> - Pembalut yang ideal harus menjamin proses penyembuhan luka dengan biaya yang wajar.

2. 5 URAIAN BAKTERI

1. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

a. Klasifikasi

Kingdom : *Bacteria*
 Filum : *Proteobacteria*
 Kelas : *Gamma Proteobacteria*
 Ordo : *Pseudomonadales*
 Famili : *Pseudomonadaceae*
 Genus : *Pseudomonas*
 Species : *Pseudomonas Aeruginosa*

b. Morfologi

P. aeruginosa adalah bakteri yang bersifat motil dan berbentuk batang, dengan ukuran sekitar 0.6 x 2 µm. bakteri ini tergolong kelompok bakteri gram negative dan dapat muncul dalam bentuk tunggal, berpasangan atau kadang-kadang dalam bentuk rantai pendek (St. Geme & Rempe, 2018).

2. Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi

Kingdom : *Bacteria*
 Filum : *Firmicutes*

Kelas : *Bacili*
 Ordo : *Bacillales*
 Famili : *Staphylococcaceae*
 Genus : *Staphylococcus*
 Species : *Staphylococcus aureus*

b. Morfologi

Bakteri *Staphylococcus aureus* (dari asal kata “*staphyle*” berarti setangkai anggur, “*kokkus*” berarti bulat/butir atau beri “*aureus*” berarti emas merupakan bakteri gram positif, tidak bergerak (non motil), dan bersifat fakultatif anaerob. Bakteri ini memiliki bentuk sferis, berukuran 0,5-1,5 µm, membentuk koloni tunggal dan koloni seperti anggur, hidup baik pada konsentrasi NaCl 10% dan inti sel tahan terhadap pemanasan. *Staphylococcus aureus* dapat memproduksi asam secara aerobik dari fruktosa, malosa dan sukrosa. Dinding sel bakteri SA sama seperti bakteri lainnya. Dinding selnya tebal (60-80 nm), terbentuk dari peptidoglikan, asam teikoat dan protein. Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S.aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat di antaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *S.aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik, kontaminasi langsung *S.aureus* pada luka terbuka (seperti luka pascabedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosocomial.

3. MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) adalah bakteri *S.aureus* yang telah menjadi resisten terhadap antibiotik jenis metisilin. Resistensi suatu bakteri dapat terjadi karena pemberian antibiotik yang tidak tepat dosis, diagnosis yang salah, dan tidak tepat sasaran bakteri penyebabnya. Bakteri MRSA akan membentuk protein transmembran yang dikenal dengan protein refluks dan plasmid yang mengkode gen resisten terhadap suatu antibiotik. Bakteri MRSA mengalami resistensi antibiotik disebabkan oleh terjadinya perubahan genetik yang disebabkan terapi antibiotik yang tidak rasional. Faktor-faktor resiko terjadinya MRSA antara lain lingkungan, populasi, kontak olahraga, kebersihan individu, riwayat perawatan, riwayat operasi, riwayat infeksi dan penyakit, riwayat pengobatan, serta kondisi medis. Bakteri MRSA umumnya menyebar melalui kontak langsung pada luka terbuka atau sayatan operasi yang dapat menimbulkan infeksi berat. Bakteri MRSA awalnya mengenai kulit dan jaringan lunak, namun dengan cepat dapat menimbulkan sepsis dan atau pneumonia yang dapat menimbulkan kematian (Mahmudah et al., 2013).

2.6 HEWAN COBA

1. Klasifikasi Mencit

Klasifikasi Mencit (*Mus musculus*) (Nugroho, R.A, 2018) yaitu sebagai berikut :

Kingdom : *Animalia*
 Filum : *Chordata*
 Sub filum : *Vertebrata*
 Class : *Mamalia*
 Sub class : *Theria*
 Ordo : *Rodentia*

Sub ordo : *Myomorpha*
 Famili : *Muridae*
 Sub family : *Murinae*
 Genus : *Mus*
 Species : *Mus musculus*

2. Karakteristik Mencit

Mencit (*Mus musculus*) memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan, yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganannya. Mencit memiliki bulu pendek halus berwarna putih serta ekor berwarna kemerahan dengan ukuran lebih panjang dari pada badan dan kepala. Ciri-ciri lain mencit secara umum adalah bentuk hidung kerucut terpotong, bentuk badan silindris agak membesar ke belakang, serta mata berwarna merah (Nugroho, R.A, 2018). Adapun beberapa strain mencit yang digunakan dalam penelitian eksperimen di laboratorium, diantaranya adalah : Swiss webster, A/Jak, Balb/C, Bab b/c, C3H, GRS/Ajs (GR), A/J, C57BL/6.

Berat badan betina : 18 – 35 g
 Berat badan jantan : 20 – 40 g
 Luas permukaan tubuh : 0.03 – 0.06 cm²
 Masa hidup : 1- 4 tahun
 Rumus Vertebrae : C7 T13 L6 S4 Cd28
 Matang seksual : 5 – 6 minggu

3. Model Penyembuhan Luka Hewan

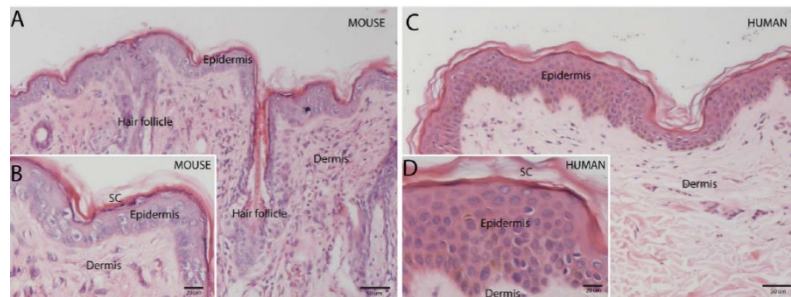
Model hewan dalam penyembuhan luka telah banyak digunakan dalam penelitian. Studi ini memerlukan model yang relevan dalam hal struktur dan imunologi untuk menilai respons kulit dan mengurangi risiko uji klinis pada manusia nantinya. Selain kesamaan anatomis dan fungsional dengan manusia, Pemilihan model hewan tergantung pula pada faktor lain, seperti ketersediaan hewan, kemudahan penanganan, dan keakraban peneliti. Hewan yang paling sering digunakan untuk mempelajari respons kulit adalah mamalia kecil seperti kelinci, marmut, tikus, dan mencit karena harganya murah dan mudah ditangani. Adapun perbandingan karakteristik kulit pada beberapa spesies mamalia (Summerfield et al., 2015) dapat dilihat pada (tabel 6)

Tabel 6. Perbandingan Struktur & karakteristik kulit manusia dan model hewan mamalia (Summerfield et al., 2015)

Kriteria	Manusia	Mencit	Tikus	Babi
Pelekatan Kulit	Melekat kuat	Longgar	Longgar	Melekat kuat
Rambut/Bulu	Jarang/tersebar	Lebat (Kecuali beberapa ras)	Lebat (Kecuali beberapa ras)	Jarang/tersebar
Epidermis	Tebal	Tipis	Tipis	Tebal
Dermis	Tebal	Tipis	Tipis	Tebal
<i>Panniculus carnosus</i>	Tidak ada	Ada	Ada	Tidak ada
Penyembuhan	Reepitalisasi	Kontraksi	Kontraksi	Reepitalisasi

Kriteria	Manusia	Mencit	Tikus	Babi
Luka				

Mencit dan tikus cukup berbeda dari segi anatomis dan fungsional dibanding manusia karena mereka memiliki lapisan jaringan subkutan tambahan yang disebut *Panniculus carnosus*. Lapisan otot ekstra ini memungkinkan penyembuhan luka melalui kontraksi, tanpa meninggalkan bekas luka dibandingkan dengan babi dan manusia yang sembuh melalui epitelisasi ulang melalui pembentukan luka. Adapun secara histologis, terdapat perbedaan struktur pada kulit mencit dan tikus dibandingkan dengan manusia, seperti epidermis dan dermis yang secara signifikan lebih tipis pada mencit/tikus ditunjukkan pada gambar 12.



Gambar 12. Perbedaan Struktur Kulit Manusia dan Mencit (Salgado et al., 2017)

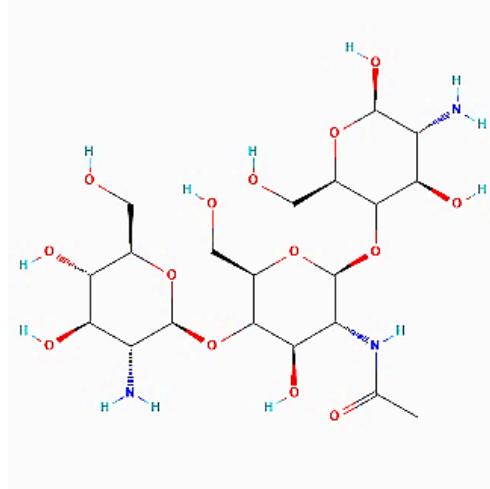
Pada tingkat yang lebih makroskopis, manusia dan babi memiliki kulit yang melekat kuat sedangkan mencit dan tikus memiliki kulit yang melekat longgar. Meskipun tampak bahwa dari perspektif struktur, kulit babi ialah model hewan yang paling dekat dengan manusia, namun penggunaannya dalam penelitian, perlu mempertimbangan faktor lain. Model hewan babi jarang digunakan secara luas dalam studi penyembuhan luka karena kebutuhan akan fasilitas dan adaptasi yang lebih besar selain itu ketersediaan dan jumlah populasi yang digunakan akan lebih minim dibanding dengan penggunaan model hewan mamalia kecil seperti mencit.

2.7 MONOGRAFI BAHAN

1. Karboksimetil Kitosan

Karboksimetil kitosan dengan rumus molekul $C_{20}H_{37}N_3O_{14}$ dan berat molekul 543.5 kDa. Kitosan terutama dicirikan dari berat molekulnya (MW) dan derajat asetilasi (DA). Kitosan komersial tersedia dengan > 85% unit deasetilasi (DA < 15%), dan berat molekul (MW) antara 100 dan 1000 kDa. Tidak ada standar khusus untuk mendefinisikan MW, tetapi dapat ditentukan bahwa MW Rendah berada pada rentang < 50 kDa, MW sedang 50 – 150 kDa, dan MW Tinggi > 150 kDa (Goy et al., 2009). Kitosan termasuk basa lemah dan tidak larut dalam air, tetapi larut dalam larutan asam encer di bawah pKa (~6.3), yang mana dapat mengubah unit glukosamin ($-NH_2$) menjadi bentuk terprotonasi yang larut ($-NH_3^+$). Kelarutan kitosan tergantung pada asal biologisnya, berat molekul dan derajat asetilasi (Goy et al., 2009). Kitosan merupakan polisakarida bermuatan positif yang terdiri dari banyak gugus amino yang berasal dari kerangka luar *crustacea* dengan karakteristik struktural mirip dengan glikosaminoglikan (GAG); salah satu komponen utama dari ECM.

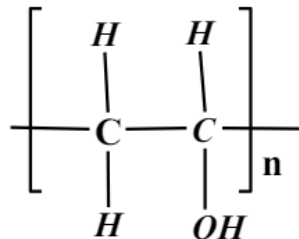
Karena kemiripannya ini, kitosan juga biokompatibel, biodegradable, dan hidrofilik. Sehingga berdasar daripada karakteristik diatas, kitosan ideal untuk diformulasi menjadi self-healing hidrogel melalui mekanisme ikatan kovalen dinamis senyawa imina/enamin (Talebian et al., 2019).



Gambar 13. Struktur Kimia Carboxymethyl Chitosan (Pubchem, 2022)

2. Polivinyl Alkohol

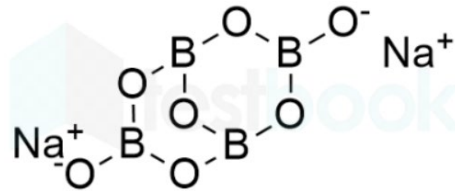
Poli (Vinil Alkohol) PVA dengan nama lain , *Polyvinyl Alcohol*, *Liquifilm Tears*, *Polyviol*, Ethenol diketahui berbentuk granul atau serbuk amorf putih krem, tidak berbau/berasa, pH (5-8) pada larutan 4%, dan sangat hidrofilik. PVA dengan rumus molekul CH_2CHOH dan berat molekul 44.05 kDa, larut dalam air, dan sedikit larut dalam alcohol memiliki titik lebur pada 212-267 °C dan titik didih 644 °F (sekitar 760 mmHg) (Pubchem, 2022b). PVA biokompatibel, non toksik, dan unik karena memiliki banyak gugus hidroksilnya, ditambah dengan sifat retensi airnya yang tinggi, menjadikannya kandidat ideal self healing hidrogel. Adapun self-healing berbasis PVA dapat dibuat melalui mekanisme penyembuhan yang didasarkan pada ikatan hidrogen reversibel (Talebian *et al.*, 2019).



Gambar 14. Struktur Kimia PVA (Salman & Bakr, 2018)

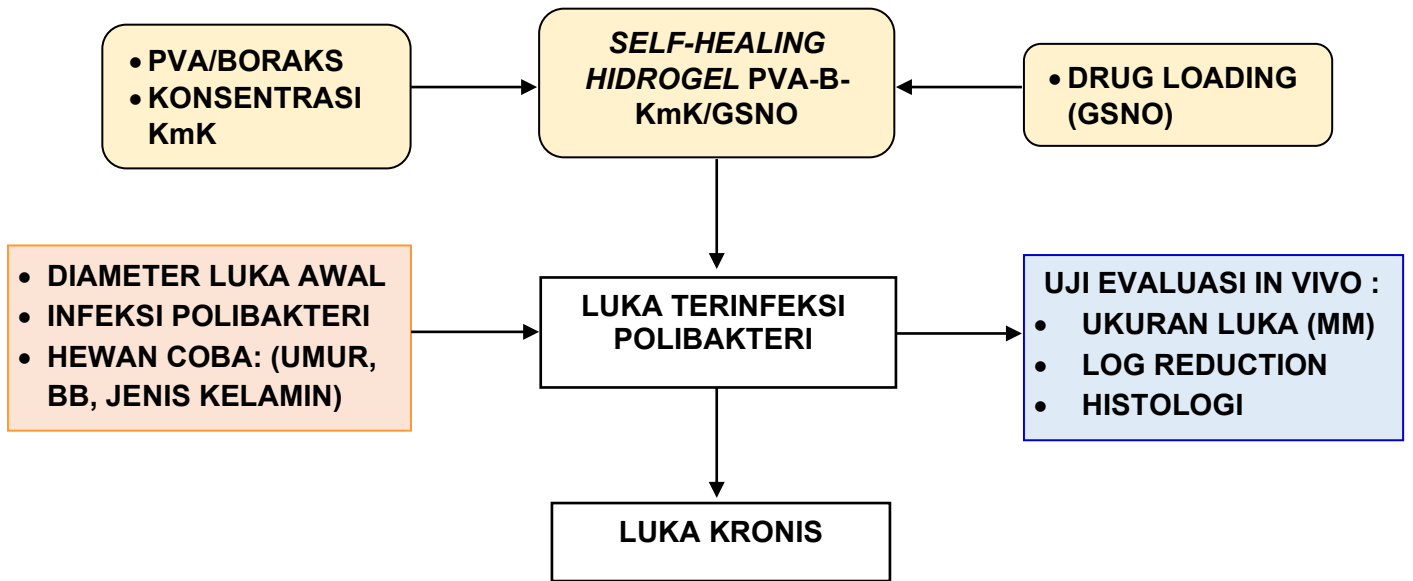
3. Boraks

Boraks dengan nama lain disodium borate, *Sodium pyroborate decahydrate*, *Borax* diketahui berbentuk granul atau serbuk kristal putih, tidak berbau, berasa alkali, pH (9.2) pada larutan 1%, Boraks dengan rumus molekul $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ dan berat molekul 381.4 kDa, memiliki titik lebur pada 75°C dan titik didih 608°F .

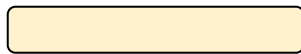


Gambar 15. Struktur Kimia Boraks (Messner et al., 2022)

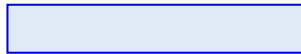
2. 8 KERANGKA KONSEP



Keterangan :



: Variabel Bebas

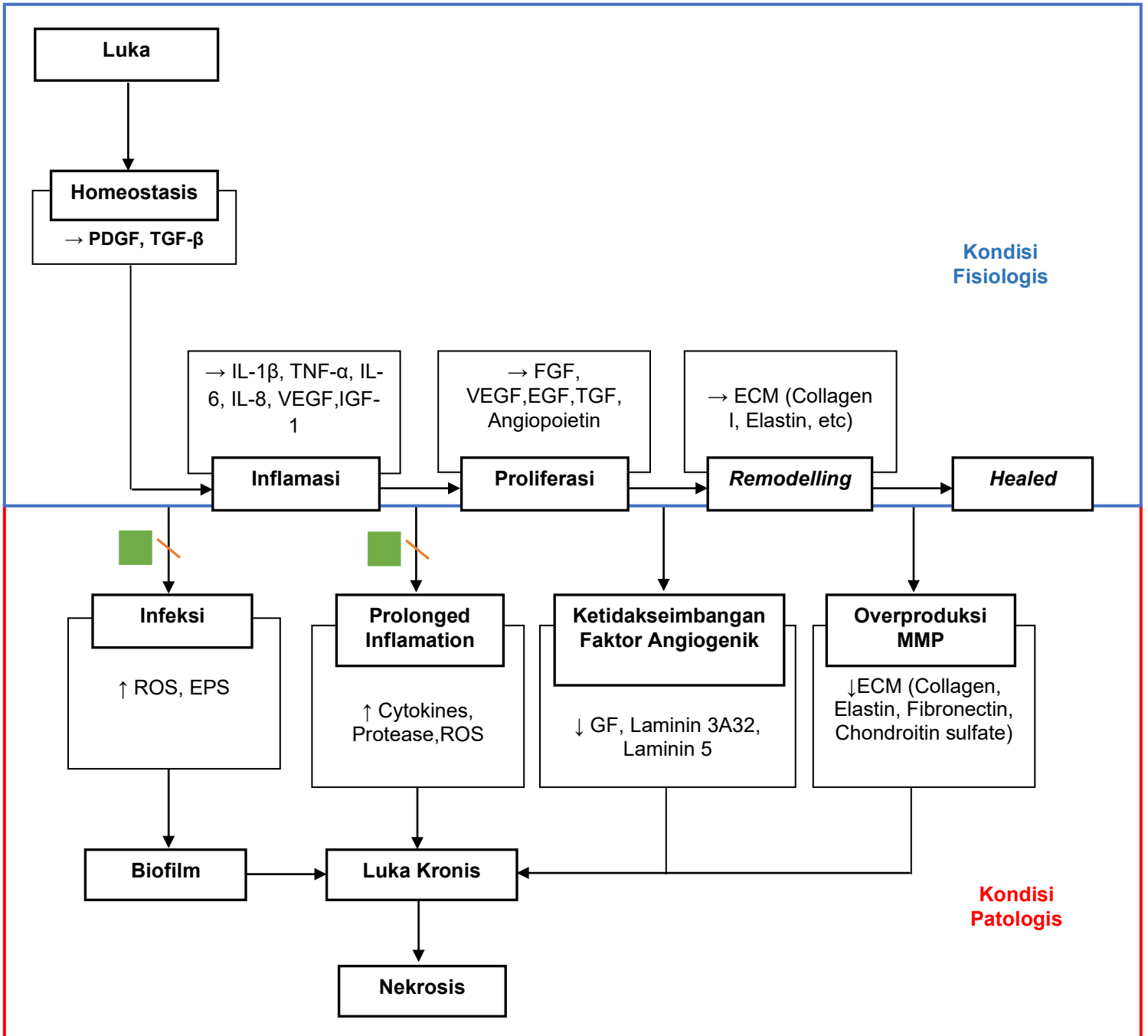


: Variabel Terikat



: Variabel Kendali

2.9 KERANGKA TEORI



Ket :

- : Self-Healing Hydrogel
- : Penghambatan

2. 10 HIPOTESIS

1. Hipotesis Nol (H₀)

Tidak terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo*.

2. Hipotesis Alternatif (H_a)

Terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian sediaan optimal *self healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KmK/GSNO) terhadap luka terinfeksi polibakteri secara *in vivo*.