

Pengaruh Pemberian *+dalethyne* Terhadap Jumlah Ekspresi IL-1 β Pada Tikus yang Diinfeksi *P.aeruginosa*

Waode Fifin Ervina^{*1}, Agung Dwi Wahyu Widodo², Yoes Prijata Dahlan³

¹Program Studi S2 Imunologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Airlangga

²Program Studi S2 Imunologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Airlangga

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

e-mail: ^{*1}vinaervina51@yahoo.com, ²agung@yahoo.com

Abstrak

Infeksi nosokomial sampai sekarang masih merupakan masalah perawatan kesehatan di rumah sakit seluruh dunia. Salah satu patogen nosokomial yang dapat menginfeksi penderita yang di rawat di rumah sakit adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Saat ini infeksi *P.aeruginosa* pada pasien di rumah sakit mengalami resistensi terhadap berbagai antibiotik. Bakteri *P.aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif dan intraseluler yang dimana apabila menginfeksi sel host akan memproduksi sitokin proinflamasi yang berlebihan khususnya IL-1 β dengan berbagai pathway. Pemberian *+dalethyne* diklaim dapat menekan produksi IL-1 β dan mempercepat penyembuhan luka. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni laboratorium (*True Ekperimental*) menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Hasil yang didapatkan dari perbandingan nilai mean antara kelompok yang diberi luka vc diberi luka dan bakteri vs diberi luka, bakteri dan *+dalethyne* yang diamati pada hari ke4 secara berturut-turut adalah 33 ± 16 vs 42 ± 18 vs 29 ± 5 . Terlihat bahwa *+dalethyne* dapat menurunkan jumlah IL-1 β karena memiliki kandungan senyawa aldehyde yang dapat menghambat produksi NF-Kb dan signaling JAK2/STAT1. Dengan begitu fase inflamasi pada area luka akan cepat terhenti dan memasuki fase proliferasi dan remodeling jaringan Sehingga pemberian *+dalethyne* merupakan salah satu pengobatan alternatif yang bisa digunakan pada pasien penderita infeksi nosokomial pasca bedah atau luka bakar.

Kata kunci: Infeksi Nosokomial, *Pseudomonas aeruginosa*, Interleukin (IL)-1 β , Aldehyd.

Abstract

Nosocomial infection is still a problem of health care in hospitals worldwide. One nosocomial pathogen that can infect patients treated in the hospital is Pseudomonas aeruginos. Currently P.aeruginosa infection in patients in hospitals are resistant to various antibiotics. P.aeruginosa bacteria are gram-negative bacteria and intracellular wherein when infecting host cells will produce excessive proinflammatory cytokines, especially IL-1 β with different pathway. Giving + dalethyne claimed to suppress the production of IL-1 β and accelerate wound healing. This research is a purely experimental research laboratory (True experimental) using a study design Post Test Only Control Group Design. Results obtained from the comparison of mean values between the group given by injuries and wounds vc vs bacteria by wound, bacteria and + dalethyne observed on the 4th day in a row is 33 ± 16 vs 42 ± 18 vs 29 ± 5 . + Dalethyne looks that can reduce the amount of IL-1 β because it contains aldehyde compounds that can inhibit the production of NF-Kb and signaling JAK2 / STAT1. Thus the inflammatory phase in the wound area will quickly stalled and entered a phase of proliferation and tissue remodeling Thus Award + dalethyne is one alternative treatment that can be used in patients with post-surgical nosocomial infections or burns.

Keywords: Nosocomial infection, *Pseudomonas aeruginosa*, Interleukin (IL)-1 β , Aldehyde.

1. PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial sampai sekarang masih merupakan masalah perawatan kesehatan di rumah sakit seluruh dunia. Menurut catatan WHO tahun 2016, di negara maju tercatat 7 kasus dari 100 penderita yang masuk rumah sakit terkena nosokomial, sedangkan di negara berkembang terdapat 10 kasus dari 100 pasien yang ada di rumah sakit. Sementara di tahun 2013, terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa lebih dari 20% dari infeksi nosokomial terjadi di Ruang ICU dan menjadi penyebab utama kematian pada pasien khususnya yang terbaring di ICU (Kemenkes RI, 2014).

Salah satu patogen nosokomial yang dapat menginfeksi penderita yang di rawat di rumah sakit adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Infeksi yang terjadi berupa pneumonia, infeksi pada mata, infeksi pada luka bakar atau luka bedah, infeksi kulit, infeksi saluran kemih, bakteremia dan septicemia. Target utama bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah pasien fibrosis kistik, jaringan basah seperti membran mukosa atau area di sekitar kulit yang terjadi injury.

Peningkatan insiden infeksi oleh *Pseudomonas aeruginosa* pada pasien rumah sakit ternyata juga diikuti oleh peningkatan kejadian resistensi terhadap berbagai antibiotik. Antibiotik yang resisten terhadap bakteri ini adalah β -lactam, ciprofloxacin, tobramycin dan colistin. Beberapa faktor yang menyebabkan bakteri ini resisten yaitu antibiotik memiliki permeabilitas yang rendah dan terjadi mutasi gen kromosomal pada bakteri. Oleh karena itu dibutuhkan senyawa yang dapat meningkatkan system imun dan sel-sel yang berpengaruh terhadap pemusnahan bakteri dan merepair jaringan kulit yang mengalami injury (Rehm, 2008).

Seperti yang diketahui bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri intraseluler yang memicu produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β berlebihan yang berakibat perpanjangan fase inflamasi sehingga lukapun akan lama penyembuhannya sehingga diperlukan senyawa/zat yang dapat berperan sebagai imunoregulator dalam menyeimbangkan kelebihan produksi sitokin IL-1 β dan dapat menstimulus pembentukan jaringan baru di kulit. +dalethyne merupakan pecahan kandungan minyak zaitun menjadi zat baru yaitu aldehyde. Sehingga dengan begitu perlu diadakannya penelitian ini untuk menguji pengaruh +dalethyne dalam meregulasi sel-sel imun dalam membantu proses penyembuhan luka dengan melihat ekspresi IL-1 β .

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infeksi Nosokomial

Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang didapatkan oleh seseorang selama dalam masa perawatan atau pemeriksaan di rumah sakit dalam waktu 3x24 jam sejak mereka masuk rumah sakit tanpa adanya tanda tanda infeksi sebelumnya (Depkes, 2003).

Pseudomonas aeruginosa merupakan penyebab infeksi nosokomial khususnya pada pasien yang memiliki imunitas rendah, pasien dengan luka bakar dan dapat menyebabkan infeksi kronik pada pasien fibrosis kistik. *P. aeruginosa* dapat resisten terhadap berbagai macam antibiotic. Bakteri ini dapat dijumpai di lingkungan, tanah, air dan kotoran, bahkan terdapat di mukosa farings dan kulit yang sehat. Infeksi pada manusia umumnya terjadi pada penderita dengan keadaan system imun menurun. Bakteri ini diketahui dapat melakukan kolonisasi di unit operasi, medis, persalinan, dan perawatan luka bakar dalam suatu rumah sakit.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeruginosa merupakan anggota dari kelas Gamma Proteobacteria. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang dengan ukuran 0,5-0,8 μ m kali 1,5-3,0 μ m. Hampir semua strain adalah motil dengan satu flagel kutub (single polar flagellum).

Pada penelitian Freeze-etched dalam Kahlon menemukan bahwa *P.aeruginosa* memiliki sel envelope yang berbeda-beda dimana terdiri dari 9 lapisan, 5 diantaranya yaitu (L1, L3, L5, L7 dan L9) yang merupakan electron-dense dan sisanya merupakan lapisan yang transparan. L1, merupakan lapisan yang lembut yang berisikan lipid dengan konsentrasi yang tinggi, L1 dan L3 terdiri dari phospholipid dan lipopolisakarida (LPS). LPS merupakan struktur antigenik yang berada di luar sel dan dapat terdeteksi apabila berinteraksi dengan sel lain secara serologic. L2 merupakan lapisan yang transparan yang berisikan protein seperti lipoprotein dan glikoprotein (Kahlon, et al, 2016).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen utama pada lapisan luar bakteri

gram negatif dan merupakan carbohydrate-lipid kompleks yang terdiri dari 3 domain yaitu Lipid A yang merupakan bagian terluar dari lipopolisakarida; core oligosaccharide yang berada di tengah dan O-antigen atau yang dikenal juga dengan O-polisakarida yang merupakan rantai panjang pada polisakarida. LPS menjadi komponen pada lapisan luar pada membran luar dan memiliki peran penting dalam merespon organism yang berada di lingkungan sekitar.

LPS pada *P.aeruginosa* berperan dalam virulens dan rantai O-polisakarida merupakan tempat melekatnya antibody. Bakteri ini memiliki 2 variabel dari LPS yang dikenal yaitu “B-band LPS” (dikenal dengan O-specific antigen—OSA) dan “A-band LPS” (yang dikenal dengan polysaccharide antigen—CPA— atau common O-polysaccharide chains). Selain itu juga LPS *P.aeruginosa* memiliki 3 domain yaitu biphosphorylated, D-glucosamine dan disaccharide-lipid A complex; core oligosakarida terdiri dari 9-10 gugusan gula.

P.aeruginosa dalam proses perlekatan dengan sel host membutuhkan reseptor yaitu pilus-associated protein PilY1. Ikatan antara reseptor bakteri ini dan sel host terdapat pada permukaan basolateral (Heiniger, *et al.* 2010). Kemampuan *P.aeruginosa* untuk masuk ke dalam jaringan bergantung pada produksi enzim ekstraselular dan toksin yang menyebabkan pertahanan physical barriers bisa ditembus, merusak sel host, menyebabkan resistensi terhadap fagositosis dan menurunkan imunitas sel host. Beberapa faktor virulens yang disekresi oleh *P.aeruginosa* yaitu exotoxin A (ETA), dan empat type III (T3) secreted effectors [exoenzyme S (ExoS), exoenzyme T (ExoT), exoenzyme U (ExoU), and exoenzyme Y (ExoY)] (Alouf, *et al.*, 2015).

Telah banyak hewan uji yang digunakan untuk mengetahui pathogenesis dari *P.aeruginosa*. Model ini dapat menggambarkan manifestasi klinik terhadap infeksi *P.aeruginosa*. Sama seperti infeksi pada manusia, hewan coba yang diinfeksi oleh bakteri ini secara umum membutuhkan beberapa faktor penyebab terjadinya infeksi,

seperti luka (luka bakar), menurunnya system imun (neutropenia atau usia muda) dan kontaminasi langsung dengan bakteri. Pada kasus luka bakar dimana diinokulasikan *P.aeruginosa* ke daerah luka sehingga menyebabkan pathogenesis dari bakteri ini dengan kontribusi dari ETA dan system T3. Pasien dengan immunosupresan khususnya pada penderita neutropenia menyebabkan mudahnya bakteri ini untuk menginfeksi penderita dan terjadi sepsis.

ETA merupakan sitotoksik terhadap sel imun termasuk neutrofil dan makrofag toksis ini dapat berefek terhadap *innate and adaptive immunity* dengan cara menghambat presentasi antigen, produksi sitokin dan fagositosis. Sehingga bakteri ini dapat menyebabkan kerusakan organ (khususnya kerusakan hati). ETA disekresi di dalam ekstraselular dan ditransport ke seluruh host dengan target jaringan dan organ. ETA berikatan dengan sel mammalian melalui reseptor *alpha 2-macroglobulin receptor/LRP* protein, dimana internalisasi ETA melalui reseptor yang diperantarai oleh endositosis.

Pada saat reseptor telah terdistribusi secara luas sehingga menyebabkan organ dan jaringan menjadi berbahaya. ETA memfasilitasi *P. aeruginosa* untuk masuk ke dalam sel host. Produksi ETA sebagai pro-enzim yang diaktifkan pada permukaan sel oleh furin yang memfasilitasi mekanisme untuk memberikan toksin selama transport ke seluruh sel. Pada awal penelitian diindikasikan bahwa ETA secara signifikan berkontribusi dalam kematian hewan coba dengan luka bakar. Toksik ETA menyebabkan kerusakan hati yang berat dan menyebabkan kematian. Selain itu juga toksin ETA dapat menghambat sintesis protein aktivasi sel T sehingga menghasilkan produksi TNF- α .

Toksik T3SS pada bakteri *P.aeruginosa* juga berkontribusi dalam

semakin beratnya penyakit. Infeksi ExoU secara khusus berkontribusi dalam luka pada epithelial paru-paru, menyebarkan infeksi sehingga menyebabkan kematian pada neonatal dan hewan coba dewasa yang menderita pneumonia. ExoS berkontribusi dalam kolonisasi bakteri pada paru-paru dan menyebar luaskan infeksi ke daerah limfa pada hewan coba dengan pneumonia akut. ExoT memiliki efek yang kurang dibandingkan ExoS dan ExoU pada penderita pneumonia, sehingga untuk datanya masih meragukan apakah ExoT dapat meningkatkan penyebaran bakteri pada pneumonia akut. ExoY sama sekali tidak memberikan efek dibandingkan ExoU, ExoS, dan ExoT pada hewan coba dengan pneumonia dan hewan yang memiliki imunitas rendah. Namun ExoY dapat mencegah pembentukan endothelial paru-paru setelah infeksi pada pneumonia akut. Hasil penelitian menunjukkan ExoS dan ExoU dapat menghambat produksi interleukin-1 β melalui *in vivo*, dimana merupakan komponen utama pada respon inflamasi dan dapat berkontribusi dalam pemusnahan bakteri. Sel-sel system imun seperti neutrofil, monosit, dan makrofag merupakan target utama pada toksin T3SS untuk mengawali infeksi (Alouf, *et al*, 2015).

P. aeruginosa juga memproduksi berbagai molekul kecil yang secara langsung dapat menghambat sel-sel imun. Pyocyanin, sebuah redox-active phenazine dapat memicu apoptosis neutrofil baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Dimana cara kerjanya yaitu siklus redok ini akan melibatkan pyocyanin dan NADPH pada sel host sehingga menghasilkan oksidatif yang tinggi (menghasilkan ROS dan H₂O₂) sehingga terjadi nekrosis. Dengan begitu menyebabkan peningkatan sitosolik kalsium, respirasi selular dan ekspresi ATPase pada membran epithelial sehingga akan lebih mudah membantu proses infeksi. Proses ini juga dapat

menghambat perkembangan sel epidermal dan proliferasi limfosit. Selain itu juga bakteri ini mensekresi rhamnolipid yang dapat menyebabkan nekrosis pada neutrofil. Rhamnolipid merupakan molekul ampifatik yang memiliki *tensioactive* dimana mampu menurunkan tekanan pada permukaan, membentuk emulsi dan menyebabkan *pseudosolubilization* dari substrat yang tidak dapat larut sehingga menyebabkan *P.aeruginosa* untuk dapat berada di berbagai *niches*. Yang terakhir, bakteri ini memproduksi Type IV pili (TFP) pada *P.aeruginosa* secara spesifik dilibatkan dalam proses perlekatan bakteri terhadap jaringan host, virulensi dan pembentukan biofilm. TFP merupakan polimer yang disusun utamanya oleh *single repeating* subunit yang disebut dengan pilin yang dikode oleh gen pilA (Kahlon, *et al*, 2016).

Produksi Pyocyanin, rhamnolipid dan TFP diregulasi oleh signal yang dikeluarkan oleh bakteri dan mengekspresikan dalam jumlah besar ketika bakteri berada pada fase yang tetap atau pada kondisi dengan densitas yang tinggi seperti biofilm (Lavoie, *et al*, 2011).

2.3 Struktur kulit

Kulit merupakan pertahanan pertama dalam menghadapi microorganism di lingkungan sekitar, kulit terdiri dari tiga lapisan jaringan yang mempunyai fungsi dan karakteristik berbeda. Ketiga lapisan tersebut yaitu: lapisan epidermis, lapisan dermis, dan lapisan subkutan (Andersson dan Nettelblad, 2009).

A. Lapisan epidermis

Lapisan ini merupakan lapisan paling tipis dan terluar dari kulit. Sangat penting dalam kosmetika karena lapisan ini memberikan tekstur, kelembaban serta warna kulit. Sel penyusun utama lapisan epidermis adalah keratinosit. Keratinosit diproduksi oleh lapisan sel basal. Apabila keratinosit matang akan bergerak ke lapisan di atasnya yang disebut dengan proses keratinisasi.

Lapisan epidermis dibagi menjadi empat lapisan yaitu:

- Lapisan sel basal (stratum basale)

Merupakan lapisan paling bawah dari epidermis yang terletak di atas lamina basalis pada perbatasan epidermis-dermis. Bentuk selnya adalah kuboid. Lapisan sel basal berfungsi melindungi epidermis dengan selalu memperbarui selnya. Lapisan ini mengandung banyak keratinosit. Selain itu, juga terdapat sel melanosit untuk mensintesis melanin dan sel Merkel untuk sensasi.

- Lapisan sel prickle (stratum spinosum)

Merupakan lapisan paling bawah kedua setelah lapisan sel basal. Terdiri atas sel-sel kuboid, atau agak gepeng dengan inti ditengah dan sitoplasma dengan cabang-cabang yang terisi berkas filament. Sel ini berbentuk polihedral dengan inti bulat merupakan hasil pembelahan dari sel basal yang bergerak ke atas dan saling dihubungkan dengan desmosom.

- Lapisan sel granuler (stratum granulosum)

Merupakan lapisan dengan butiran / granula keratohialin di dalam sel. terdiri atas 3–5 lapis sel poligonal gepeng yang sitoplasmanya berisikan granula basofilik kasar. Pada lapisan ini, selnya berbentuk datar dan tidak ada intinya. Granula keratohialin mengandung profilagrin dan akan berubah menjadi filagrin dalam dua sampai tiga hari. Filagrin akan terdegradasi menjadi molekul yang berkontribusi terhadap hidrasi pada stratum korneum dan membantu penyerapan radiasi sinar ultraviolet.

- Lapisan lusidum, tampak lebih jelas pada kulit tebal, lapisan ini bersifat translusens dan terdiri atas lapisan tipis sel epidermis eosinofilik yang sangat gepeng

- Lapisan sel tanduk (stratum korneum)

Merupakan lapisan paling superfisial dari epidermis. Lapisan ini terdiri atas 15–20 lapis sel gepeng berkeratin tanpa inti dengan sitoplasma yang dipenuhi skleroprotein filamentosa birefringen, yakni keratin. Pada lapisan ini, keratinosit yang sudah matang akan

mengalami proses keratinisasi. Lapisan ini memberikan perlindungan mekanik pada kulit dan sebagai barier untuk mencegah kehilangan air pada kulit atau untuk mencegah terjadi transepidermal water loss (TEWL).

B. Lapisan dermis

Merupakan lapisan yang terletak di antara lapisan epidermis dan subkutan. Lapisan ini lebih tebal daripada lapisan epidermis. Ketebalan lapisan epidermis bervariasi tergantung usia. Semakin tua, ketebalan dan kelembaban kulit akan menurun. Saraf, pembuluh darah, dan kelenjar keringat ada pada lapisan ini. Sel penyusun utama lapisan dermis adalah fibroblas yang mensintesis kolagen, elastin dan glikosaminoglikan. Lapisan ini berfungsi untuk melekatkan lapisan epidermis dan dermis, mempertahankan terhadap kerusakan dari luar, serta mempertahankan integritas kulit.

Dermis terdiri atas 2 lapisan dengan batas yang tidak nyata, stratum papillare di sebelah luar dan stratum retikular yang lebih dalam, yaitu:

a. Stratum papilar, terdiri atas jaringan ikat longgar, fibroblas dan sel jaringan ikat lainnya terdapat di stratum ini seperti sel mast dan makrofag. Dari lapisan ini, serabut lapisan kolagen khusus menyelip ke dalam lamina basalis dan meluas ke dalam dermis. Serabut kolagen tersebut mengikat dermis pada epidermis dan disebut serabut penambat.

b. Stratum retikular, terdiri atas jaringan ikat padat tak teratur (terutama kolagen tipe I), dan oleh karena itu memiliki lebih banyak serat dan lebih sedikit sel daripada stratum papilar. Dermis kaya dengan jaring-jaring pembuluh darah dan limfa. Di daerah kulit tertentu, darah dapat langsung mengalir dari arteri ke dalam vena melalui anastomosis atau pirau arteriovenosa. Pirau ini berperan sangat penting pada pengaturan suhu. Selain komponen tersebut, dermis mengandung beberapa turunan epidermis, yaitu

folikel rambut kelenjar keringat dan kelenjar sebacea.

Dermis kaya dengan jaringan pembuluh darah dan limfa. Di daerah kulit tertentu, darah dapat langsung mengalir dari arteri ke dalam vena melalui anastomosis atau pirau arteriovenosa. Pirau ini berperan sangat penting pada pengaturan suhu. Selain komponen tersebut, dermis mengandung beberapa turunan epidermis, yaitu folikel rambut kelenjar keringat dan kelenjar sebacea

C. Lapisan subkutan / hypodermis

Lapisan ini terletak di bawah lapisan dermis. Terdiri dari jaringan ikat longgar dan lemak. Sel utama lapisan subkutan adalah adiposit, merupakan sel mesenkimal khusus yang menjadi tempat penyimpanan lemak, sangat penting sebagai sumber energi bagi tubuh. Hipodermis sering mengandung sel-sel lemak yang jumlahnya bervariasi sesuai daerah tubuh dan ukuran yang bervariasi sesuai dengan status gizi yang bersangkutan. Lapisan ini juga disebut sebagai jaringan subkutan dan jika cukup tebal disebut panikulus adiposus. Selain itu, pada kulit juga terdapat apendiks kulit. Yang termasuk di dalam apendiks kulit, yaitu: kuku, rambut, kelenjar sebacea, kelenjar ektrin, dan kelenjar apokrin (Andersson dan Nettelblad, 2009).

2.4 Wound Healing

Luka merupakan gangguan atau kerusakan pada secara fungsional dan anatomi pada organ normal. Secara klinik luka dapat diklasifikasikan dalam 2 kriteria, dimana waktu merupakan faktor yang penting dalam manajemen injury dan perbaikan luka yaitu luka akut dan luka kronik.

A. Luka Akut

Pada luka akut organ/jaringan dapat *me-repair* dirinya sendiri secara normal dimana dapat menghasilkan perbaikan pada struktur anatomi dan fungsionalnya. Waktu yang dibutuhkan

pada luka akut yaitu 5 sampai 10 hari atau dalam 30 hari.

B. Luka Kronik

Luka kronik merupakan pertanda bahwa dalam proses penyembuhan luka terdapat kesalahan sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama. Beberapa faktor yang mempengaruhinya yaitu adanya infeksi, hipoksia jaringan, nekrosis, dan kelebihan sitokin inflamatori yang dihasilkan. Hal ini dapat terjadi baik pada fase hemostatis, inflamasi dan proliferasi atau remodeling. Luka kronik juga dapat disebabkan oleh *naturopathic, pressure, arterial* dan *venous insufficiency, burns* dan *vasculitis* (Velnar *et al*, 2009).

Penyembuhan luka merupakan rangkaian proses yang sangat kompleks dimana melibatkan interaksi ko-ordinasi antara berbagai macam *immunological* dan *system biologi*. Dalam tahapannya memerlukan cascade secara hati-hati dan tepat dalam meregulasi setiap tahapannya dan juga dapat berkorelasi dengan berbagai jenis sel yang ada pada daerah luka selama dalam proses fase penyembuhan luka. Pada luka akut terdapat beberapa fase dalam proses penyembuhan luka yang dipicu oleh kerusakan jaringan/organ, yang dibagi dalam beberapa tahapan yaitu: koagulasi dan hemostasis merupakan tahap awal setelah terjadinya injury; inflamasi merupakan tahap kedua; proliferasi merupakan tahap ketiga yang terjadi sesaat setelah injury dan merupakan proses utama dalam penyembuhan luka dan pembentukan granulasi jaringan; dan *remodeling* dimana scar jaringan akan menuju ke tempat injury dan membentuk jaringan baru, pada tahap ini membutuhkan waktu setahun atau lebih (Velnar *et al*, 2009).

Pada fase inflamasi melibatkan sel-sel humoral dan selular pada respon imun karena tahap ini melibatkan infeksi pada mikroorganisme. Fase ini dibagi menjadi dua tahapan yaitu inflamasi awal dan inflamasi akhir.

Inflamasi awal dimulai pada akhir fase koagulasi dan fase ini memiliki banyak fungsi. Pada fase ini mengaktifkan cascade complement dan mengawali tahapan

molekular yang menghasilkan infiltrasi neutrofil pada daerah luka, dimana berfungsi sebagai fagositosis dalam mencegah infeksi dan membunuh mikroorganisme yang masuk.

Lama neutrofil berada pada daerah luka yaitu 24-36 jam yang distimulus oleh berbagai macam kemoatraktif seperti TGF- β , komponen complement seperti C3a dan C5a, dan *formylmethionyl peptides* yang dihasilkan oleh bakteri dan platelet. Hal ini sesuai dengan penelitian Lucas yang menyatakan bahwa neutrofil bertransmigrasi melalui dinding sel endothelial pada pembuluh darah melalui adhesi P- dan E-selektin dan juga *inter-cellular adhesion molecules 1 dan 2* (ICAM-1 dan -2).

Inflamasi akhir Pada tahap ini waktu yang dibutuhkan yaitu 48-72 jam setelah injury. Tahap ini makrofag muncul dan melanjutkan proses fagosit pada daerah luka. Makrofag yang masuk ke daerah luka ditarik oleh beberapa kemoatraktif seperti *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) dan chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2, yang dikenal sebagai *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) yang disekresi oleh platelet, keratinosit, fibroblast dan leukosit (Lucas, Tina. 2011).

Penelitian saat ini menunjukkan bahwa fibroblast pada kulit disebut sebagai pertahanan pertama dan dapat mengekspresikan beberapa TLR (*Toll-like receptors*). Pertahanan pertama ini disebut dengan *innate immune system*, dimana dapat mengenal PAMPs (Patogen-associated molecular patterns) oleh anggota TLRs (*Toll-like receptors*). Dari 11 jumlah TLRs, TLR 4 (Hajjar, et al, 2002), TLR5 (Zhang, et al, 2003), TLR 9 (Greence, et al, 2005) dan NLRP3 yang berperan dalam mengenal bakteri ini. Anggota PAMPs dari bakteri *P. aeruginosa* yang dikenal yaitu (1) LPS (Lipopolisakarida) merupakan komponen terluar pada membran dinding sel yang terdiri dari O polysaccharide, core dan lipid A (2) flagelin, dan (3) cpG DNA. Ikatan antara PAMPs dan TLRs ini akan mengaktifkan MyD88 dan caspase 1 dengan begitu melepaskan NF- κ B dan AP-1. Selanjutnya masuk ke dalam nucleus dan mengaktifkan sitokin pro-inflamatori (TNF- α , IL-1 β dan IL-6).

2.5 Patogenesis Infeksi *P. aeruginosa*

P.aeruginosa memiliki reseptor yang digunakan untuk dapat berikatan dengan jaringan luka yang dikenal dengan pilus-associated protein PilY1, dimana ikatan ini diekspresikan pada permukaan basolateral sel host (Heiniger, et al, 2010).

Ikatan ini akan menyebabkan aktivasi Rac yang merupakan keluarga dari GTPase. Fungsi dari Rac yaitu dapat meningkatkan perpindahan komponen sitosolik ke membran sehingga mengaktifkan oksidasi NADPH. Reaksi oksidasi NADPH dapat menyebabkan peningkatan kebutuhan oksigen oleh sel dimana dikenal dengan *respiratory burst*. Sehingga akan menghasilkan anion superoksid yang terdapat di dalam lumen fagolisosom dan dibentuk oleh *superoxide dismutase* (SOD) menjadi H₂O₂. Melalui proses kimia dan reaksi enzimatik H₂O₂ akan memproduksi ROS (reactive oxygen species), *the hydroxyl radical* (*OH), *hypochlorite* (OCL⁻) dan *hypobromite* (OBR⁻) (Akira, et al, 2017). Selain itu juga terjadinya injury dapat menyebabkan peningkatan Ca²⁺ dan pelepasan ekstraselular ATP oleh enzim ectoenzym. Pelepasan ATP dan ROS ini dapat menyebabkan DAMPs (Cordeiro, 2013).

2.6 Fibroblast

Oksigenasi jaringan atau hipoksia memiliki peran penting selama terjadi injury. Hipoksia memiliki faktor transkripsi seperti *hypoxia inducible factor* (HIF)-1 α yang dapat meningkatkan stimulus hipoksik (Kendall dan Carol, 2014). Keadaan hipoksia ini akan menstimulus aktivasi fibroblast, dimana hipoksia akan menginduksi CCL3 dan CXCL8 pada dermal fibroblasts. Fibroblast berperan pada proses inflamasi dan penarikan sel-sel imun ketempat injury (CCL3 and CXCL8 in dermal fibroblasts (Enzerink dan Vaheri, 2011). Fibroblast dapat memproduksi dan merespon berbagai sitokin inflamatori seperti TGF β 1, IL-1 β , interleukin-6 (IL-6), IL-13, IL-33, CXC, kemokin CC, ROS dan leukatrin. Sitokin dan kemokin tersebut dapat membantu aktivasi dan migrasi sel imun residen seperti makrofag. Juga dapat membantu penarikan sel-sel imun yang berada pada pembuluh darah. Fibroblast

yang distimulasi secara kimiawi oleh agen inflamatori akan berdiferensiasi menjadi miofibroblast yang dapat meregulasi untuk memproduksi matriks.

Fibroblast juga mengekspresikan TLR, terdapat 10 TLR yang diekspresikan pada fibroblast di jaringan kulit. Stimulasi fibroblast pada kulit dengan masing-masing ligannya dapat meningkatkan interleukin-6 (IL-6), IL-8 dan *matrix metalloproteinase-1*, diindikasikan bahwa semua TLR pada fibroblast di kulit dapat berfungsi dengan baik. Stimulasi fibroblast pada kulit dengan ligan TLR1/2, 3 dan 4 dapat menginduksi fosforilasi dari inhibitor nuclear factor κ B dan mengaktifkan fosforilasi sinyal ekstraseluler yang diregulasi oleh kinase $\frac{1}{2}$ (Yao, *et al.*, 2015).

TLR 4, 5 dan 9 akan mengaktifkan MyD88. Terdapat dua protein domain MyD88 yang bertanggung jawab atas fungsinya sebagai adaptor. *Death domain* MyD88 dapat menarik dan mengaktifkan 2 serin threonin protein kinase IRAK4 (*IL1-receptor associated kinase 4*) dan IRAK 1 melalui death domainnya. , IRAK kompleks merekrut TRAF 6 (*TNF receptor associated factor 6*) sebuah E3 ubiquitin ligase yang bekerja sama dengan UBC13 yang merupakan E2 ubiquitin ligase dan cofaktornya Uve1A (yang disebut juga TRIKA1). Aktivasi gabungan dari TRAF 6 dan UBC13 adalah untuk melekatkan satu molekul ubiquitin dengan protein lainnya atau dengan molekul ubiquitin lainnya sehingga dapat menghasilkan protein polimer (Akira *et al.*, 2015).

TRAF 6 mengaktifkan serin threonin kinase TAK 1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) dan MAP (Mitogen-activated protein) kinase, kemudian mengaktifkan AP-1. TAK 1 memfosforilasi dan mengaktifkan I κ B kinase (IKK) kompleks yang disusun oleh 3 protein : IKK α , IKK β dan IKK γ atau dikenal dengan NEMO. Aktivasi IKK akan memfosforilasi I κ B kemudian akan mengalami degradasi dan melepaskan NF- κ B. NF- κ B kemudian masuk ke dalam nucleus dan aktifasi AP-1 (fos, jun) mengaktifkan sitokin proinflamatori (TNF- α , IL-1 β dan IL-6) (Abbas, *et al.*, 2015).

TGF β , IL-1 β , dan IL-6 merupakan sitokin yang diproduksi oleh fibroblast dan

dapat menginduksi kembali fibroblast untuk meningkatkan inflamasi dan respon fibrotic. TGF β merupakan sitokin prototypic profibrotic, yang berperan pada fibroblast dan myofibroblasts untuk meningkatkan proliferasi, migrasi, produksi matrik dan produksi sinyal kemotaktik yang dapat meningkatkan penarikan leukosit ke tempat injury, fibrosis dan diferensiasi fibroblast menjadi myofibroblasts. Ekspresi dan pelepasan sitokin IL-1 β diinduksi oleh berbagai sel termasuk fibroblast selama proses inflamasi. IL-1 β merupakan sitokin pro-inflamatori poten yang juga dapat menginduksi produksi sitokin PDGF dan TGF β . Faktor autokrin fibroblast yang menyebabkan fibrosis yaitu *hepatocyte growth factor* (HGF). HGF merupakan protein yang diproduksi oleh fibroblast dan dapat berikatan dengan reseptor tyrosine kinase c-Met yang diekspresikan pada sel epithelial terdekat, sel endothelial dan fibroblast. HGF juga berperan penting dalam penyembuhan luka, angiogenesis dan tumorigenesis (Kendall dan Carol, 2014).

2.7 Molekul Adhesi

Molekul adhesi, integrin, selektin dan ligan kemokin merupakan mediator paling penting dalam migrasi sel dimana dapat meningkatkan interaksi matrix sel. Integrin merupakan anggota dari protein transmembran yang disusun dari dua rantai polipeptida, α dan β . Domain ekstraselular pada protein berikatan dengan berbagai macam ligan seperti molekul yang diekspresikan pada endothelium dan komponen matrix ekstraselular (fibrinektin, laminine, vitrinektin, fibrinogen dan lainnya). Domain sitoplasmik akan berinteraksi dengan komponen sitoskeletal. Integrin yang banyak diketahui yaitu pertama, antigen *very late activation-4* (VLA-4) dimana diekspresikan pada leukosit dan berinteraksi dengan *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) yang diproduksi oleh endothelium. Kedua,

molekul *the leukocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) yang diekspresikan pada leukosit dan berinteraksi dengan *intercellular adhesion molecule-1 and 2* (ICAM-1 dan 2) yang diproduksi oleh sel-sel endothelial. Ikatan antara integrin dan ligannya memiliki afinitas yang tinggi (Tsirogianni *et al*, 2006).

Setelah awal fase respon imun, sitokin proinflamatori bekerja pada sel endothelial di *postcapillary venules* dan menginduksi molekul adhesi seperti E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1. Leukosit mengekspresikan ligan karbohidrat yang berada di tepi mikrovili untuk mengikat selektin endothelial E dan P, proses ini dikenal dengan istilah “*tethering*”. Interaksi ini memiliki afinitas yang lemah dan leukosit mulai untuk bergerak ke permukaan endothelial dikarenakan oleh adanya aliran darah. Sementara kemokin yang diproduksi di bagian luar akan masuk ke dalam pembuluh darah. Signaling kemokin oleh karena pergerakan leukosit menyebabkan perubahan struktur pada integrin LFA-1 dan VLA-4, dengan demikian dapat mengikat ICAM-1 dan VCAM-1 dengan afinitas yang tinggi. Hal ini akan menyebabkan terjadinya perlekatan yang kuat serta kemokin dapat menstimulasi extravasation dan migrasi sel untuk menuju ke daerah luka (Tsirogianni *et al*, 2006).

2.8 +dalethyne

Salah satu kadungan +dalethyne adalah aldehyd. Pada penelitian Wei, *et al* tahun 2010, mengungkapkan bahwa aldehyde secara kuat dapat berfungsi sebagai anti inflamatori dimana dapat menekan ekspresi ICAM-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, TNF- α , IL-6 dan CD40 pada sel endothelial. Selain itu, aldehyde juga dapat menghambat pembentukan NF κ B dengan menghambat protein I κ B. Selain itu, penelitian Akram, *et al* tahun 2016 dengan menggunakan aldehyde mendapatkan hasil bahwa aldehyd secara signifikan merupakan anti-inflamasi baik secara *in vivo* maupun *in vitro* yang

dapat menurunkan produksi *nitric oxide* (NO) dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang diekspresikan oleh makrofag. Aldehyde ini dapat menurunkan fosforilasi *Janus kinase 2* (JAK2) dan *signal Transducers and Activators of Transcription 1* (STAT1).

3. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni laboratorium (*True Ekperimental*) menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design* (pengambilan data dilakukan setelah dilakukan perlakuan) dan kemudian dibandingkan dengan antar kelompoknya. Adapun perbandingan kelompok tersebut yaitu kelompok (1) luka + infeksi bakteri, (2) luka, (3) luka+infeksi bakteri dan +dalethyne. Objek penelitian ini yaitu tikus galur wistar (*Rattus Novergicus*) dengan jumlah masing-masing kelompok perlakuan 6 ekor. Sehingga jumlah keseluruhan tikus yang dikorbankan yaitu 36 ekor tikus. Jenis tikus *Rattus norvegicus* strain *Whistar*, jenis kelamin jantan, berumur 2-3 bulan. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* dengan suspensi $1,5 \times 10^8$ sel/ml yang didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi RSU. Dr. Soetomo, Surabaya.

Tikus yang diberi luka insisi pada daerah punggung sebesar 2 cm dengan kedalaman luka hingga mencapai daerah dermis kulit. Kemudian kelompok 3 diberi +dalethyne dan pada hari ke4 masing-masing kelompok tikus dikorbankan untuk dilihat jumlah ekspresi IL-1 β pada jaringan kulit dengan menggunakan metode imunohistokimia. Antibodi primer yang digunakan yaitu bioss bs 6319 conjugated HRP dan antibodi sekunder Thermo.

3.1 Pemberian +dalethyne dan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada Tikus Uji

Kelompok yang diberikan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada daerah luka insisi sebanyak 50 microliter. Pada

kelompok perlakuan diberikan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebanyak 50 microliter kemudian diolesi dengan +*dalethyne* menggunakan *cotton bath* sebanyak 10 mg. Selanjutnya pada hari 4 masing-masing kelompok tikus dikorbankan untuk diambil jaringan kulitnya

3.2 Pewarnaan Imunohistokimia IL-1 β

Cara untuk mewarnai IL-1 β adalah jaringan kulit yang telah disayat dengan microtome yang sudah diletakkan pada objek glass kemudian dilakukan deparafinasi, yaitu menghilangkan paraffin yang ada di dalam jaringan. Adapun caranya dengan memasukkan sayatan jaringan tersebut secara berturut-turut ke dalam xylol sebanyak 3 kali (masing-masing 2 menit), kemudian dimasukkan secara berturut-turut ke dalam etanol dengan konsentrasi bertahap menurun yaitu mulai dari etanol 100% (3 kali) masing-masing 1 menit, kemudian 95% (2 kali) masing-masing 1 menit, selanjutnya etanol 90%, 80% dan 70% masing-masing 1 menit. Setelah itu dilakukan pencucian dengan air keran sekitar 5 menit kemudian dimasukkan peroksida 3% (30 menit) untuk menghilangkan peroksidase endogenus. Kemudian dilakukan pencucian dengan air, lalu dibilas dengan aquadesilat, kemudian ditambahkan PBS masing-masing selama 2 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam trypsin 0,025% dalam PBS (pH 7,4) selama 6 menit pada suhu 37⁰C. Kemudian cuci dengan PBS sebanyak 3 kali (masing-masing 2 menit). Lalu dimasukkan primer antibody monoclonal (mouse anti – Rat IL-1 β) selama 30 menit, kemudian cuci dengan PBS sebanyak 3 kali (masing-masing 2 menit), selanjutnya dimasukkan sekunder antibody monoclonal yaitu Rabbit anti mouse biotinaled label selama 30 menit. Selanjutnya dicuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 2 menit). Selanjutnya

berturut-turut dimasukkan ke dalam streptavidin HRP selama 30 menit selanjutnya dicuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 2 menit), dimasukkan ke dalam substrat kromogen: 5 menit (DAB solution), dicuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 2 menit) kemudian dibilas dengan aquadesilat dan dimasukkan ke dalam Mayer Hematoxylin : 6 menit, dicuci dengan air mengalir. Kemudian dimounting dan diamati/dibaca hasilnya pada mikroskop cahaya pembesaran 400x dalam 10 lapangan pandang (Mayer and Walker, 1990; Sudiana, 2005).

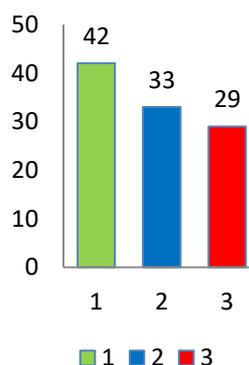
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasi Penelitian

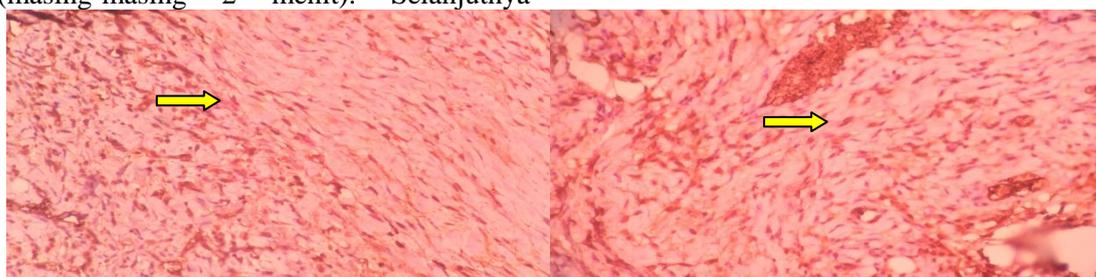
Tabel 4.1

Hasil Pengamatan Nilai Mean IL-1 β

	1	2	3
Mean \pm SD	42 \pm 18	33 \pm 16	29 \pm 5
Median	45	33	31



Gambar 1 : Perbandingan nilai mean pada masing-masing kelompok. Kelompok 1 merupakan tikus yang diberi luka+infeksi, kelompok 2 tikus yang diberi luka dan kelompok 3 tikus yang diberi luka+infeksi+*dalethyne*



Luka + infeksi pembesaran 400X

Luka pembesaran 400X



Luka + infeksi + *dalathyne* pembesaran 400X

Pada hasil penelitian didapatkan bahwa jumlah IL-1- β yang diekspresikan pada sel fibroblast terjadi penurunan dari kelompok yang diberi luka+infeksi+dalathyne, diikuti oleh kelompok yang diberi luka dan terakhir kelompok yang diberi luka+infeksi.

4.2 Pembahasan

Secara fisiologis proses inflamasi pada daerah luka terjadi sekitar 3 hari kemudian akan masuk ke fase proinflamasi namun apabila luka diinfeksi oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* maka proses inflamasi ini akan bertambah panjang. Diketahui bahwa *P.aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif dan memiliki superantigen seperti eksotoksin sehingga untuk pemusnahannya diperlukan waktu yang cukup lama. Sel host yang terinfeksi oleh *P.aeruginosa* akan mengenalnya dengan beberapa ligan yaitu lipopolisakarida (LPS) dan flagel.

Setelah terjadi injury maka jaringan kulit akan memicu peningkatan intaseluler Ca^{2+} dan pembentukan H_2O_2 atau peningkatan ATP ekstraseluler. ATP yang keluar ini dikenal sebagai DAMPs (Damage-associated molecular patterns) kemudian berikatan dengan purin reseptor P2Y pada sel yang sehat kemudian akan melepaskan sinyal sitoplasmik yang menyebabkan aktivasi Ca^{2+} intraseluler dan metalloproteinase. Hal ini mengakibatkan pelepasan ligan EGFR yaitu HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*). Pelepasan ATP dan Ca^{2+} dapat mengaktifkan sinyal PI3K-AKT dan ERK-MAPK pada sel epithelial. Selain itu juga daerah injury akan mengalami hipoksia, keadaan hipoksia ini akan menstimulus aktivasi fibroblast. Setelah tikus diberi luka insisi punggung kemudian diinfeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan diberikan *+dalathyne* sebagai antibiotic. Fibroblast juga mengekspresikan TLR maka ada beberapa jalur yang diaktifkan yaitu: (1) pengenalan

cpG DNA dengan TLR 9, (2) Pengenalan ligan dari bakteri yaitu lipopolisakarida (LPS) yang dikenal oleh TLR4. (3) Flagel oleh TLR 5 (3), dan (4) Flagel oleh NLRP3 di dalam sitosol. Pada jalur (1), (2) dan (3) akan mengaktifkan MyD88. TIR domain MyD88 berinteraksi dengan TIR domain TLR sehingga mengaktifkan 2 serin threonin protein kinase IRAK4 (IL1-receptor associated kinase 4) dan IRAK 1. IRAK kompleks merekrut TRAF 6 (TNF receptor associated factor 6) sebuah E3 ubiquitin ligase. E2 ligase TRICA1 berperan bersama TRAF 6 menghasilkan scaffold rantai poliubiquitin pada TRAF 6 itu sendiri dan mengaktifkan serin threonin kinase TAK 1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) dan MAP (Mitogen-activated protein) kinase. TAK 1 memforforilasi dan mengaktifkan I κ B kinase (IKK) kompleks yang disusun oleh 3 protein : IKK α , IKK β dan IKK γ atau dikenal dengan NEMO. Aktivasi IKK akan memfosforilasi I κ B kemudian akan mengalami degradasi dan melepaskan NF- κ B. NF- κ B kemudian masuk ke dalam nucleus dan mengaktifkan sitokin proinflamatori khususnya IL-1 β . Kemudian pada jalur (4) terjadi ikatan antara Flagel oleh NLRP3. Ikatan ini akan membentuk oligomer dan mengikat adaptor protein yang disebut dengan ASC. Kemudian ikatan antara ASC dan sensor dari NLRP3 ini akan mengaktifkan incaspase-1, materi bakteri yang berupa flagel (rod) akan masuk ke dalam sitosol melalui T3SS dan mengaktifkan pro-IL1 β . Pro-IL1 β akan berinteraksi dengan incaspase-1 sehingga mengaktifkan IL-1 β .

Selain itu TRAF 6 juga mengaktifkan MAP kinase yang merangsang aktivasi JNK (c-Jun N-terminal kinase) dan fos. JNK dan fos merupakan dua komponen penyusun AP-1 (Activator protein-1). NF κ B dan AP-1 menstimulasi aktivasi sitokin

proinflamasi seperti IL-12, IL-1 β , TNF- α , IL-6 juga meningkatkan aktivasi ROS (Reactive oxygen species). Selain itu juga, fibroblast dapat menstimulasi IL-1 β yang berefek autokrin.

Dengan begitu produksi IL-1 β akan meningkat dan memperpanjang masa inflamasi. Dengan pemberian +*dalethyne* pada kelompok diberi luka+infeksi proses penyembuhan luka akan lebih cepat dibandingkan kelompok yang diberi luka+infeksi. Hal ini disebabkan +*dalethyne* memiliki kandungan aldehyde serta asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan myristicine. Kandungan senyawa ini diklaim dapat membantu proses bakterisidal bakteri dan mempercepat penyembuhan luka. Efek aldehyde yaitu sebagai anti-inflamasi dimana dapat menurunkan dan menghambat pembentukan NF κ B dengan cara menekan menekan ICAM-1, VCAM-1, CD40, TNF- α dan IL-6. Selain itu juga dapat menghambat signaling JAK2/STAT1 dan ekspresi iNOS. Sedangkan efek dari asam palmitat, asam stearat, asam oleat dan asam linoleat yaitu dapat berperan dalam proses membunuh bakteri dengan cara meningkatkan pelepasan Ca²⁺ ekstraseluler dan intraseluler serta H₂O₂ sehingga menginduksi ROS (reactive oxygen species).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini dapat disimpulkan bawa dengan pemberian +*dalethyne* efektif dapat menurunkan jumlah IL-1 β yang diekspresikan oleh sel fibroblast pada hari keempat dimana dalam waktu itu fase inflamasi masih meningkat.

Adapun saran yaitu perlu diadakan penelitian selanjutnya tentang penggunaan +*dalethyne* pada kasus pasien penderita infeksi nosokomial yang disebabkan oleh bakteri gram positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, Abul K; Andrew H. Lichtman dan Shiv Pilai. 2015. *Cellular and Molecular Immunology*, edisi 8. Elsevier Saunders. Philadelphia.
- Akira, *et al*, editor Kenneth Murphey dan Casey Weaver. 2017. *Janeway's*

Immunobiology edisi 9. Garland Science, New York and London.

- Akram, *et al*. 2016. *Selective inhibition of JAK2/STAT1 signaling and iNOS expression mediates the anti-inflammatory effects of coniferyl aldehyde*. *ChemicoBiological Interactions*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.029>.
- Alouf, Joseph; Daniel dan Michael. 2015. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Elsevier.
- Andersson dan Nettelblad, 2009. *From Basic Wound Healing to Modern Skin Engineering*. N. Hakim (ed.), *Artificial Organs, New Techniques in Surgery Series 4*, DOI 10.1007/978-1-84882-283-2_6.
- Cordeiro dan Antonio. 2013. *The Role Of Transcription-Independent Damage Signals In The Initiation Of Epithelial Wound Healing*. *Nature reviews, molecular cell biology* volume 14.
- Depkes RI. 2003. *Infeksi Nosokomial*. Jakarta : Depkes RI.
- Enzerink dan Vaheiri, 2011. *Fibroblast activation in vascular inflammation*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9: 619–626.
- Greene, C. M., Carroll, T. P., Smith, S. G., Taggart, C. C., Devaney, J., Griffin, S.,
- Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Tsai, J. H., Wilson, C. B., and Miller, S. I. (2002). *The Functional and Structural Properties of MD-2 Required for P.aeruginosa* *Nat. Immunol.* 3,354–359.
- Heiniger, *et al*. 2010. *Infection of Human Mucosa Tissue and By Pseudomonas aeruginosa requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesion*. Departement of

- Microbiology and Immunology. Cellular Microbiology. 12(8),1158-1173.
- Kahlon, *et al*, 2016. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer International Publishing Switzerland.
- Kendall dan Carol. 2015. *Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators*. Frontiersin, doi: 10.3389/fphar.2014.00123.
- Kemenkes RI, 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2014*. Jakarta : Kemenkes RI.
- Lavoie, Elise; Tamding dan Barbara. 2011. *Innate immune responses to Pseudomonas aeruginosa infection*. Microbes Infect. 2011 December ; 13(14-15): 1133–1145. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.
- Lucas, Tina. 2011. *Dynamics, regulation and function of macrophages in skin repair*. J Immunol, 184(7):3964-77.
- O’Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2005) *Toll like receptor bakteria*. J. Immunol.174,1638–1646.
- Rehm, 2008. *Pseudomonas Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,Weinheim.
- Sudiana, I Ketut, 2004. *Teknologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia*. Sagung Seto, Surabaya.
- Tsirogianni, et al, 2006. *Wound healing: Immunological aspects*. doi:10.1016/j.injury.2006.02.035.
- Velnar, Bailey dan Smrkolj. 2009. *The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms*. The Journal of International Medical Research. 2009; 37: 1528 – 1542 [first published online as 37(5) 12].
- Wei,*et al*. 2010. *Anti-inflammatory Effect of Protocatechuic Aldehyde on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury In VivoandIn Vitro*. DOI: 10.1007/s10753-012-9581-z.
- Yao, *et al*. 2015. *Toll-like receptor family members in skin fibroblastsare functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes*. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2146.