

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Osteomyelitis adalah suatu proses inflamasi tulang yang terjadi akibat adanya infeksi mikroorganisme yang mengakibatkan destruksi tulang lokal dan nekrosis, yang meliputi sumsum tulang yang cenderung meluas ke korteks, periosteum, dan jaringan lunak yang sulit untuk disembuhkan serta memiliki kecenderungan kambuh (Lu, *et al.*, 2016; Rosenberg dan Khurana, 2016; Balanger, 2017). Osteomyelitis disebabkan infeksi mikroba seperti *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus albus* (*S. albus*), *Actinomyces* dan beberapa patogen lain yang kemudian menyebabkan proses auto-inflamasi (Hatzenbuehler dan Pulling, 2011; Josse *et al.*, 2015). Pada tulang maksilofasial, osteomyelitis lebih banyak terjadi pada mandibula namun dapat menjangkiti tulang maksila (Balanger, *et al.*, 2017).

Berdasarkan Zurich System, secara klinis dan perjalanan penyakitnya osteomyelitis diklasifikasikan menjadi 3 kriteria yaitu *acute osteomyelitis* (AO), *secondary chronic osteomyelitis* (SCO), dan *primary chronic osteomyelitis* (PCO). Perjalanan penyakit AO dalam klasifikasi Zurich terjadi dalam periode waktu 4 pekan. Onset terjadinya AO dimulai oleh karena invasi bakteri dalam tulang bagian medulla dan kortikal. AO terbagi menjadi 3 tipe berdasarkan perjalanan penyakitnya yaitu supuratif akut, supuratif subakut, dan keadaan klinis dengan atau tanpa supuratif. AO dengan supuratif akut biasanya disertai tanda inflamasi,

nyeri yang intens dan dalam, dan pembengkakan serta edema terlokalisir karena adanya abses (Baltensperger & Eyrich, 2009).

Mikroorganisme patogen penyebab osteomyelitis umumnya tergantung pada usia pasien. *S. aureus*, baik *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA) maupun *methicillin-susceptible S. aureus* (MSSA) merupakan mikroorganisme yang paling sering dijumpai menyebabkan osteomyelitis akut dan kronis pada orang dewasa maupun anak-anak. Sebesar 89-90% kasus osteomyelitis disebabkan oleh *S. aureus*, *Streptococcus* (4-7%), *Haemophilus influenza* (2-4%), *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli* (1-2%). Sebagian besar penelitian tentang infeksi tulang berpusat pada *S. aureus* karena frekuensi, plastisitas, dan resistensinya, serta karena menyebabkan sebagian besar kasus osteomyelitis. (Marx, 1991; Moser dan Gilbert, 2014).

S. aureus pada osteomyelitis dapat mengakibatkan kerusakan struktur yang hebat dikarenakan dalam invasinya ke daerah tersebut, *S. aureus* membentuk biofilm yang cukup tebal dan tidak mudah untuk dibunuh oleh antibiotik biasa. Selain dinding sel yang tebal, sekitar 80 hingga 90% strain *S. aureus* memiliki kapsul yang memberikan perlindungan bagi bakteri, karena memiliki sifat antifagositosis karena ketidakmampuan inang untuk mengenali mikroorganisme yang menyerang. Khususnya, strain *S. aureus* yang kapsul negatif telah terbukti menyebabkan infeksi kronis pada model tikus karena kemampuan mereka untuk bertahan hidup intraseluler. Kemampuan *S. aureus* dan *S. epidermidis* untuk berkoloni dan menyebabkan infeksi pejamu terutama disebabkan oleh adanya berbagai protein berlabuh dinding sel (CWA) dan faktor ekstraseluler. Pada *S. aureus*, terdapat beberapa protein MSCRAMMS dan CWA yang penting untuk

patogenisitas infeksi, termasuk protein A (SpA), protein pengikat fibronectin A dan B (FnBP A/B), protein pengikat sialoprotein tulang (Bbp), dan adhesi kolagen protein (Cna). Selain ditambatkan pada dinding sel *S. aureus*, SpA juga dapat disekresikan. Meskipun fungsi utama SpA adalah penghindaran kekebalan, penelitian telah mendokumentasikan peran langsungnya dalam infeksi tulang. Terbukti bahwa SpA dapat langsung berikatan dengan osteoblas, memediasi kematian sel, penghambatan pembentukan tulang (osteogenesis), dan induksi resorpsi tulang (osteoklastogenesis). Kedua, *S. aureus* menempati kanal dimana sitokin berada. *S. aureus* merangsang peradangan pada jaringan sehingga merangsang produksi M1 sehingga memicu terjadinya fagositosis oleh makrofag. (Kavanagh *et al*, 2018)

Osteomyelitis pada regio maksilofasial sering kali terjadi pada mandibula dan jarang sekali terjadi pada maksila karena vaskularisasi yang lebih banyak pada maksila. Kejadiannya paling sering terjadi pada usia 30-39 tahun. Insiden penyakit osteomyelitis pada negara berkembang, masih tergolong tinggi, karena sulitnya mendapatkan pengobatan definitif. Berbagai antibiotik telah digunakan dalam penanganan osteomyelitis namun prevalensi osteomyelitis masih cukup tinggi. Beberapa jurnal menyatakan bahwa penanganan klinis yang efektif terhadap osteomyelitis masih menjadi tantangan walaupun antibiotik yang unggul sudah diberikan (Wasan *et al*, 2019).

Antibiotik merupakan bahan antibakteri terhadap bakteri penyebab osteomyelitis dimana bakteri yang mendominasi adalah *Staphylococcus aureus*. Penanganan osteomyelitis membutuhkan pemberian antibiotik jangka panjang selama 4 sampai dengan 6 minggu (induksi) secara parenteral dilanjutkan 2-3

bulan peroral (konsolidasi). Pemakaian antibiotik jangka panjang dilakukan sebagai strategi alternatif, namun hal tersebut juga memberikan efek samping yang serius. Terapi antibiotik pada osteomyelitis banyak mengalami kendala terutama dalam hal kepatuhan pengobatan dan resistensi serta dapat mengalami kekambuhan. Pada penggunaan terapi antibiotik *S. aureus* memiliki kemampuan adaptasi terhadap respon imun host dan peningkatan toleransi penggunaan antibiotik sehingga memicu kegagalan terapi antibiotik pada osteomyelitis. Hingga saat ini, penanganan osteomyelitis yang tepat masih membutuhkan waktu konsolidasi yang panjang serta memerlukan terapi debridement bedah, sehingga memerlukan alternatif terapi yang lebih singkat, seperti bahan perak merupakan salah satu logam berat yang efektif sebagai agen antibakteri (Kishner, 2016).

Pemanfaatan agen perak/Argentum (Ag) sebagai antibakteri telah diketahui dan digunakan sejak lama, bahkan sebelum ditemukannya antibiotik. Beberapa tahun terakhir, terdapat banyak penelitian yang menggunakan perak dengan tujuan untuk melawan bakteri yang resisten terhadap banyak obat dengan menggunakan strategi kombinasi sehingga mempotensiasi efisiensi obat. Peningkatan resistensi bakteri terhadap sebagian besar antibiotik dalam beberapa tahun terakhir menjadi alasan utama pengkajian ulang penggunaan perak sebagai tatalaksana infeksi bakteri, termasuk penelitian menggunakan ion perak dan antibiotik (Sim, *et al.*, 2018).

Perak dalam sediaan nanopartikel dapat memicu regenerasi atau dapat digunakan untuk perawatan kelainan atau penyakit pada tulang. Secara spesifik, perak dapat memicu diferensiasi osteoblas dan menghambat proliferasi osteoklas melalui supresi jalur sinyal MAPK dan NF- κ B (Lee *et al.*, 2021). Percepatan

proses remodeling pada tulang terjadi melalui serangkaian peningkatan ekspresi *Vascular endothelial Growth Factor* (VEGF), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-2, *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), *Alkaline Phosphatase* (ALP), dan *Osteocalcin* (OCN) serta penurunan pada *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) dan *Interleukin-1 β* (IL-1 β). VEGF diamati dalam penelitian sebagai salah satu marker karena berhubungan dengan angiogenesis dan dapat menunjukkan proses pembentukan pembuluh darah baru. Osteoblas yang aktif merupakan salah satu marker pada tahap awal proses penyembuhan tulang. RUNX2 adalah faktor transkripsi yang dibutuhkan dalam proses diferensiasi osteogenik dari *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) menjadi pre-osteoblas dan kemudian menjadi osteoblas. OCN merupakan marker spesifik osteogenik yang berperan aktif dalam pembentukan dan mineralisasi tulang. RANKL dapat memicu kerusakan tulang, merupakan marker spesifik osteoklas yang berperan dalam diferensiasi *Human Stem Cell* (HSC) menjadi osteoklas (Turabelidze, 2014). Apoptosis osteosit mungkin memiliki peran penting dalam mengatur homeostasis tulang. Apoptosis osteosit terbukti meningkat pada model osteomielitis tikus, sementara tingkat ekspresi biomarker pro-inflamasi juga meningkat termasuk TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-17 (IL-17), dan IL-6, dan seterusnya (Ru dan Wang, 2020). Secara umum, metode yang digunakan dalam evaluasi massa tulang, arsitektur, dan metabolisme pada penelitian yang menggunakan tikus sebagai hewan coba sama dengan yang digunakan untuk manusia. Pengukuran kalsium, fosfor, dan magnesium dalam darah dan urin dapat diperoleh dari model tikus. Dalam analogi dengan manusia, marker biokimia yang paling umum digunakan yang mewakili pergantian tulang

"global" dapat diukur pada tikus termasuk peptida yang berasal dari osteoblas yang menunjukkan pembentukan tulang, seperti osteocalcin, atau resorpsi osteoklastik (Gasser and Kneissel, 2017).

Beberapa penelitian mengevaluasi penggunaan perak dalam bentuk ion (Ag^+) pada osteomyelitis. Ion perak menghasilkan aktivitas antimikroba, dengan aktivitas bakterisida dan bakteriostatik. Peran ion perak dalam penatalaksanaan osteomyelitis kronik dan beberapa kondisi medis lain telah banyak ditemukan. Peran penting ion perak terutama berada pada mekanisme inhibisi pembentukan biofilm (Barras, *et al.*, 2018; Brochado, *et al.*, 2018; Morones-Ramirez, *et al.*, 2013; Kemah, *et al.*, 2018).

Pemakaian perak dalam sediaan ion memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dalam sediaan nanopartikel meskipun dengan mekanisme kerja yang sama (Li, *et al.*, 2017). Cara kerja antibakteri dari ion perak berhubungan dengan: (i) interaksi dengan selubung sel bakteri (destabilisasi membran-pelepasan ion K^+ dan menurunkan kadar ATP sel, pengikatan fosfolipid), (ii) interaksi dengan molekul intrasel (asam nukleat dan enzim), (iii) produksi spesies oksigen reaktif (ROS) (Sutterlin, *et al.*, 2012). Penelitian lain juga menemukan bahwa akumulasi Ag^+ pada selubung sel bakteri diikuti dengan separasi membran sitoplasma dinding sel baik pada bakteri gram positif maupun gram negatif. Selanjutnya, ion perak merusak membran dalam sel, yang merupakan mekanisme pertahanan penting pada *Staphylococcus*. Pemeriksaan menggunakan mikroskop elektron menunjukkan kedua jenis sel bakteri (gram positif dan negatif) yang diterapi dengan ion perak mengalami lisis pada sitoplasma. (Randall, *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian telah mengevaluasi konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) pada ion perak. Konsentrasi optimal terbaik antibakteri dari ion metal membutuhkan setidaknya lebih dari 90% laju antibakteri dan lebih dari 80% laju proliferasi sel pada L929. Berdasarkan uji laju bakterisidal yang dilakukan Ning pada tahun 2016, KHM ion perak terhadap *S. aureus* dan *E. coli* ditemukan sebesar 10^{-6} - 10^{-7} M dimana ion perak memiliki aktivitas antimikroba tertentu tanpa disertai sitotoksitas. Pada kadar tersebut, laju proliferasi sel L929 (fibroblas) meningkat dengan menurunnya konsentrasi ion perak. Sementara, pada evaluasi konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditemukan bahwa konsentrasi ion perak sebesar 0,25 μ M dapat membunuh 99% *S. aureus* dan *E. coli* dalam 24 jam setelah paparan. Dalam penelitian lain, Agarwal telah melaporkan bahwa larutan perak nitrat dengan konsentrasi 0,05 mM hingga 5 mM dapat membunuh hingga 90% bakteri (Ning, *et al.*, 2016).

Toksisitas ion perak bersifat *dose-dependent*. Hingga saat ini belum terdapat informasi terkait toksisitas pada manusia yang berkaitan dengan paparan akut ion perak maupun nanopartikel perak baik melalui jalur per oral maupun topikal yang dapat diidentifikasi (WHO, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Munger terkait paparan berulang ion perak menemukan bahwa pada hewan dengan dosis 2,1-6,8 μ g/Kg BB/hari, tidak didapatkan perubahan bermakna dalam pemeriksaan metabolik, hematologi, dan urinalisis. Hasil pemeriksaan fisik dan radiologis organ tubuh juga tidak mengalami perubahan (Munger, *et al.*, 2013). Peningkatan kadar perak dalam serum yang disebabkan oleh penggunaan dosis perak sebanyak 6 g secara oral atau 1 g intravena bekepanjangan dapat menyebabkan terjadinya argyria. Argyria merupakan munculnya penampakan klinis pigmentasi biru

keabuan pada kulit, membrane mukosa, dan kuku. Argyria juga dapat menampilkan klinis rambut berwarna metalik, gingiva berwarna biru, serta pigmentasi konjunktiva cokelat keabuan (Hernandez *et al*, 2015).

Hingga saat ini belum ada penelitian yang membuktikan apakah pemberian ion perak secara sistemik efektif terhadap infeksi osteomyelitis pada mandibula dan bagaimana mekanismenya. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektifitas serta mekanisme tersebut dengan dilakukan pengamatan pada beberapa variabel penyembuhan defek tulang. Asupan air ion perak yang diberikan secara sistemik saat perawatan osteomyelitis diharapkan dapat mempercepat proses penyembuhan defek osteomyelitis pada struktur tulang dan jaringan sekitarnya secara optimal. Bagaimanakah mekanisme dan efektifitas terapi sistemik ion perak di dalam penyembuhan defek osteomyelitis tulang?

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah penyembuhan defek osteomyelitis dengan terapi sistemik ion perak terjadi melalui aktifitas anti-bakteri, penurunan resorpsi tulang, induksi penyembuhan jaringan dan peningkatan pembentukan tulang?
2. Apakah ada perbedaan jumlah makrofag pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?
3. Apakah ada perbedaan jumlah apoptosis osteosit pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?
4. Apakah ada perbedaan ekspresi RANKL pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?

5. Apakah ada perbedaan jumlah osteoklas pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?
6. Apakah ada perbedaan ekspresi VEGF pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?
7. Apakah ada perbedaan ekspresi RUNX2 pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?
8. Apakah ada perbedaan ekspresi osteocalcin pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?
9. Apakah ada perbedaan jumlah osteoblas pada defek osteomyelitis tulang mandibula pasca terapi sistemik ion perak hari ke-17, 21, 28 ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis apakah penyembuhan defek osteomyelitis dengan terapi sistemik ion perak terjadi melalui aktifitas anti-bakteri, penurunan resorpsi tulang, induksi penyembuhan jaringan dan peningkatan pembentukan tulang.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk menganalisis apakah penyembuhan defek osteomyelitis dengan terapi sistemik ion perak terjadi melalui penurunan jumlah makrofag dan apoptosis osteosit
2. Untuk menganalisis apakah penyembuhan defek osteomyelitis dengan terapi sistemik ion perak terjadi melalui peningkatan ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas

3. Untuk menganalisis apakah penyembuhan defek osteomyelitis dengan terapi sistemik ion perak terjadi melalui peningkatan ekspresi VEGF
4. Untuk menganalisis apakah penyembuhan defek osteomyelitis dengan terapi sistemik ion perak terjadi melalui peningkatan ekspresi RUNX2, Osteocalcin dan jumlah Osteoblas
5. Bagaimana hubungan antara jumlah makrofag, apoptosis osteosit, jumlah osteoklas, ekspresi VEGF, RUNX2, RANKL dan Osteocalcin di dalam proses penyembuhan defek tulang osteomyelitis pasca terapi sistemik ion perak.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

1. Memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh terapi ion perak secara sistemik pada proses penyembuhan defek osteomyelitis pada mandibula yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus*.
2. Memberikan informasi ilmiah mengenai mekanisme kerja air ion perak dalam mempercepat penyembuhan defek osteomyelitis pada mandibula yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus*.

1.4.2 Manfaat praktis

1. Menjelaskan remodeling tulang pasca defek osteomyelitis yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus* pada mandibula melalui aspek biomolekuler
2. Mengetahui kemampuan dari ion perak dalam terapi sistemik pada defek osteomyelitis pada mandibula yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus*.
3. Sebagai dasar penggunaan terapi rekayasa jaringan melalui ion perak untuk defek osteomyelitis pada mandibula yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus*.