

ARTIKEL PENELITIAN

**EFEKTIVITAS ASAM RETINOIK PADA PENYEMBUHAN LUKA PERFORASI BARU MEMBRAN TIMPANI HEWAN COBA MARMOT**

*EFFECTS OF RETINOIC ACID IN WOUND CLOSURE OF ACUTE TYMPANIC MEMBRANE PERFORATION IN GUINEA PIGS*

Daniel Widjaja

Departemen Telinga Hidung Tenggorok – Kepala Leher, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya no. 2, Jakarta Utara 14440

**Korespondensi:** daniel.widjaja@atmajaya.ac.id

**ABSTRACT**

**Introduction:** Tympanic membrane (TM) perforation is common in our practice. It may be due to infection or trauma. Retinoic acid (RA) has been studied for its effect on wound healing. It can stimulate angiogenesis and increase the rate of re-epithelialization in wounded skin. The purpose of this study is to determine the effectiveness and the rate of healing of RA in wound closure of acute TM perforations in Guinea pigs

**Methods:** This is a randomized control trial animal experimental study, twenty Guinea pigs (40 TM) were used. Randomization was done using the toss coin method to determine the intervention and control group. A small perforation using spinal needle G 20 was done. RA was introduced in the intervention group, while TM was allowed to heal spontaneously in the control group. All TM were examined on day 3, 7, 10 and 14. Recording of perforation was done with the videoendoscopic system. Measurement of the TM and the perforation was done by using a graphic program (AutoCAD R14).

**Results:** TM healed completely on day 14 in the intervention group and the control group was 52.9 % and 47.1% respectively with  $p=0.492$ . The rate of healing on day 3,7 and 10 in the intervention group and the control group was 0.15 & 0.08; 0.38 & 0.69; 0.29 & 0.58 respectively with  $p=0.01$ ; 0.003 and 0.001.

**Conclusion:** Tympanic membrane with RA treated group showed a significant healing rate on day 3,7, and 10. However, RA has no significant effect on the closure of acute traumatic perforations after day 14.

**Keywords:** perforation, retinoic acid, tympanic membrane, wound closure

**ABSTRAK**

**Pendahuluan:** Perforasi membran timpani (MT) merupakan masalah yang umum dijumpai dalam praktek sehari-hari, Infeksi atau trauma merupakan salah satu penyebab terjadinya perforasi MT. Asam retinoik (AR) telah lama diketahui mempunyai efek pada penyembuhan luka. AR dikatakan dapat menstimulasi proses angiogenesis dan meningkatkan kecepatan re-epitelisasi pada luka di kulit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh efektivitas AR dan kecepatan penyembuhan luka perforasi baru pada MT marmot.

**Metode:** Penelitian ini adalah studi eksperimental acak terkendali pada hewan percobaan, Penelitian ini melibatkan dua puluh marmot (40 MT). Pemilihan acak untuk menentukan kelompok intervensi dan kelompok kontrol dilakukan melalui metode lempar koin. Perforasi kecil pada MT dilakukan dengan menggunakan jarum spinal ukuran 20G. Pemberian AR dilakukan sekali saja pada kelompok intervensi, sedangkan pada kelompok kontrol dibiarkan sembuh spontan. Semua MT diperiksa pada hari ke-3,7,10 dan 14. Perekaman gambar perforasi dilakukan dengan menggunakan sistem videoendoskopi. Pengukuran luas area MT dan luas area perforasi dengan menggunakan program grafis (AutoCAD R14).

**Hasil:** MT yang menutup sempurna pada hari ke 14 pada kelompok intervensi dan kontrol adalah 52,9% dan 47,1% dengan  $p=0,492$ , Tingkat penutupan perforasi (TPP) pada hari ke 3, 7 dan 10 pada kelompok intervensi dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah 0,15 & 0,08; 0,38 & 0,69; 0,29 & 0,58 dengan  $p=0,01$ ; 0,003 dan 0,001.

**Simpulan:** Pemberian AR pada kelompok intervensi memberikan hasil penyembuhan luka perforasi yang lebih cepat secara signifikan pada hari ke-3, 7 dan 10, tetapi pemberian AR tidak memberikan efek penyembuhan luka perforasi setelah hari ke-14.

**Kata kunci:** asam retinoik, membran timpani, penutupan luka, perforasi

## PENDAHULUAN

Perforasi MT merupakan salah satu gejala yang sering dijumpai dalam praktek dokter THT sehari-hari. Perforasi dapat disebabkan oleh proses trauma, infeksi seperti otitis media akut, otitis media supuratif kronis ataupun akibat perforasi yang terjadi karena paska pemasangan pipa ventilasi. Walaupun hampir 90 % perforasi MT akibat trauma dapat sembuh secara spontan, sisanya akan berakhir menjadi perforasi yang kronik dan memerlukan penanganan yang lebih lanjut.<sup>1</sup> Pasien dengan perforasi MT yang persisten dapat mengalami proses infeksi menjadi otorea, tinnitus dan pembentukan kolesteatoma. Komplikasi seperti ini meningkatkan resiko penyakit yang berkelanjutan dan membutuhkan biaya serta kemungkinan tindakan operasi di kemudian hari.

MT terdiri dari 2 bagian, yaitu pars flaksida dan pars tensa. Pars flaksida terdiri dari 2 lapis yaitu lapisan epitel dan lapisan mukosa endotel, sedangkan pars tensa terdiri dari 3 lapis, yaitu lapisan epitel pada bagian eksternal, lapisan fibrosa pada bagian tengah, dan lapisan mukosa endotel pada bagian dalam.<sup>2</sup> MT mempunyai karakter yang unik pada proses penyembuhan luka perforasi. Penelitian oleh Johnson, Wang dan Araújo pada binatang percobaan menunjukkan bahwa penyembuhan perforasi MT adalah melalui mekanisme proses migrasi epitel.<sup>3-5</sup> Pusat pembentukan epitel ada di bagian annulus dan di bagian manubrium malleus. Lapisan epidermis merupakan lapisan yang pertama yang akan menutupi lubang

perforasi, dan arah dari penutupan tersebut sesuai dengan arah dari migrasi epitel. Penutupan oleh lapisan fibrosa akan terjadi sesudahnya karena pengaruh aliran vaskularisasi pembuluh darah pada MT, sedangkan lapisan mukosa endotel kurang berperan dalam proses penyembuhan lubang perforasi.

Penanganan perforasi MT karena trauma atau infeksi karena otitis media akut akan dimulai dengan cara yang konservatif seperti menjaga telinga tetap kering dan bersih serta pemberian antibiotik bila terjadi infeksi. Penanganan berupa tindakan operasi seperti timpanoplasti diperlukan bila perforasi tidak menutup lagi dan telah berlangsung selama lebih dari tiga bulan. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mempercepat proses penutupan perforasi tersebut seperti pemberian *platelet rich fibrin*, *fibroblast growth factor*, aplikasi *sea buckthorn oil patch* dan pemberian *ofloxacin gelatin patch*.<sup>6,7,8,9</sup> Semua penelitian tersebut menunjukkan hasil yang baik dan menjanjikan.

Vitamin A atau asam retinoik telah lama diketahui mempunyai efek penyembuhan pada luka di kulit dengan cara menstimulasi proses angiogenesis dan melawan efek glukokortikoid yang menghambat penyembuhan luka. Asam retinoik (AR) dapat merangsang pergantian lapisan epidermis dan meningkatkan proses re-epitelisasi pada luka di kulit.<sup>10</sup> Pengaruh AR tidak hanya pada lapisan kulit saja, tetapi juga pada lapisan epitel mukosa traktus respiratorius. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hwang, AR diketahui sebagai faktor yang penting dalam proses

pembentukan silia dan proses penyembuhan luka setelah tindakan operasi sinus maksilaris pada hewan percobaan kelinci.<sup>11</sup> Pemakaian AR secara topikal pada kulit akan meningkatkan proses fibroplasia, kolagenosis dan angiogenesis.<sup>12</sup> Asam retinoik akan mengikat secara spesifik pada reseptor di sitoplasma dan nukleus yang akan berperan pada proses pembelahan, diferensiasi sel, sintesa protein, dan stabilisasi membran sel. Asam retinoik juga menghambat aktivitas leukosit, mengeluarkan sitokin pro inflamasi dan beberapa mediator inflamasi lainnya, serta berperan sebagai *toll receptor* pada proses imunomodulasi.<sup>13</sup> Asam retinoik akan mengurangi penebalan stratum korneum dan mengembalikan proses deskuamasi yang abnormal. Efek farmakologi seperti ini telah lama digunakan sebagai salah satu cara dalam pengobatan jerawat selama beberapa dekade.<sup>14</sup>

Peran AR dalam penyembuhan luka baru pada perforasi MT belum pernah dieksplorasi sebelumnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas AR dan kecepatan penyembuhan luka perforasi baru pada MT.

## METODE

Desain penelitian ini adalah uji acak terkendali pada hewan percobaan marmot. Kelompok kasus atau kelompok intervensi adalah marmot yang akan diberikan AR, sedangkan kelompok kontrol adalah yang tidak diberikan apapun juga. Penelitian ini melibatkan dua puluh (20) marmot (40 MT) dengan kisaran berat antara 250-400 Gram.

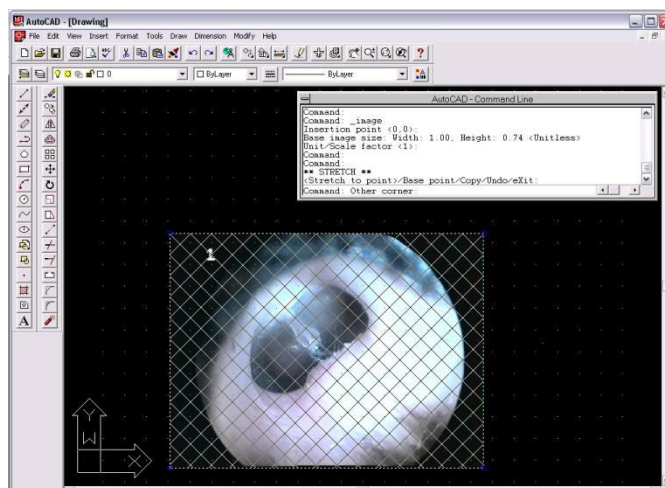
Hewan ini dipelihara dan disimpan di *skills lab* Departemen THT-KL University of Santo Tomas Hospital, Manila. Marmot dianestesi dengan injeksi secara intramuskuler menggunakan ketamin hidroklorida 25 mg pada bagian paha. Pemilihan hewan coba untuk kelompok intervensi (AR) dan kelompok kontrol adalah secara acak dengan metode *toss coin*. Marmot akan diberi nomor dan ditempatkan dalam kandang yang berbeda untuk kelompok intervensi dan kelompok kontrol.

Perforasi dilakukan menggunakan jarum spinal ukuran 20 G pada kuadran anterior superior MT dengan menggunakan mikroskop. AR kemudian diaplikasikan pada kelompok intervensi dengan menggunakan *gelfoam* pada luka perforasi MT, *gelfoam* kemudian diambil kembali secepatnya setelah aplikasi dilakukan. Alasan *gelfoam* diambil kembali secepatnya adalah *gelfoam* sendiri memiliki potensi efek penyangga dalam proses migrasi epitel yang berfungsi dalam proses penyembuhan.<sup>15</sup> Pada kelompok kontrol, MT dibiarkan sembuh sendiri tanpa diberikan apapun juga.

Semua MT dilakukan perekaman dan pengukuran pada hari ke 3, 7, 10, dan 14. Perekaman lubang perforasi dengan menggunakan teleskop 0°, diameter 4mm (Storz), yang dihubungkan dengan sistem video kamera (Mega). Gambar yang didapatkan kemudian ditransfer ke komputer. Pengukuran luas MT dan luas area perforasi dianalisa dengan menggunakan program grafis (AutoCAD R14) (Gambar 1). Hasil dari pengukuran adalah persentase luas area perforasi (PLAP) yang didapatkan dengan cara membagi luas lubang

perforasi dengan luas MT dan dikalikan 100 (Gambar 2a dan 2b). Tingkat Penutupan (TP) MT didapatkan dengan cara selisih dari PLAP hari ke-0 dengan hari ke-3, 7, 10, dan 14

dibagi dengan PLAP hari ke-0. Semua data yang didapatkan kemudian dikumpulkan dan dianalisa menggunakan program statistik SPSS V26.



**Gambar 1.** Kalkulasi luas area membran timpani dengan program grafis AutoCAD R14

**HASIL**

Pada awal penelitian terdapat 20 ekor hewan marmot, lalu hanya 17 marmot yang dapat diikuti sampai akhir penelitian. Satu marmot pada kelompok intervensi dan satu marmot dari kelompok kontrol mati selama proses penelitian. Satu marmot dari kelompok intervensi dikeluarkan dari penelitian karena marmot tersebut hamil

selama penelitian. Akhirnya hanya 34 MT yang dievaluasi yaitu 16 dari kelompok intervensi dan 18 dari kelompok kontrol.

Persentase luas area perforasi (PLAP) hari ke-0 pada kelompok intervensi adalah  $34,19 \pm 3,33$ , sedangkan pada kelompok kontrol adalah  $33,61 \pm 2,38$ . Kedua PLAP tersebut secara statistik tidak berbeda bermakna ( $p=0,562$ ) (Tabel 1).

**Tabel 1.** Persentase luas area perforasi pada hari ke-0

Kelompok	PLAP $\pm$ SD	p
Intervensi	34,19 $\pm$ 3,33	0,562
Kontrol	33,61 $\pm$ 2,38	

T test dengan alpha=0,05

**Tabel 2.** Proporsi penutupan MT antara kelompok intervensi dan kelompok kontrol

Kondisi	Intervensi	Kontrol	N
Perforasi	7(41,2)	10 (58,8)	17
Sembuh	9 (52,9)	8 (47,1)	17
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>34</b>

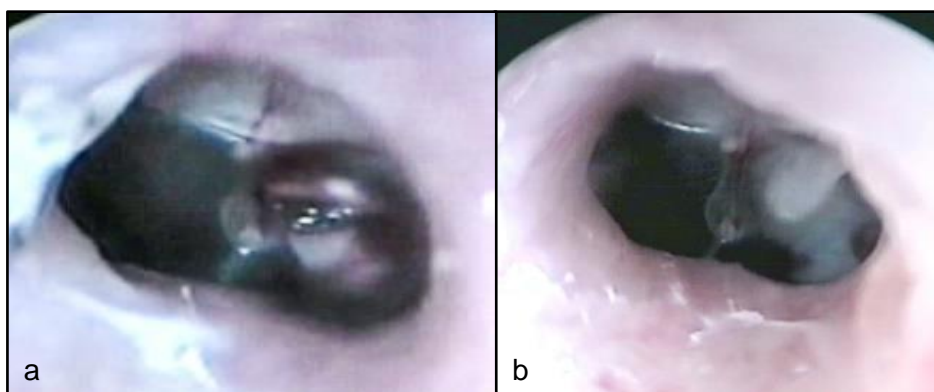
Pearson Chi-Square  $p=0,492$  dengan alpha=0,05

Proporsi penutupan sempurna dari MT (100%) pada kelompok intervensi dan kelompok kontrol pada hari ke-14 adalah 52,9% pada kelompok intervensi dan pada kelompok kontrol adalah 47,1%. Uji Chi-Square memperlihatkan bahwa ternyata tidak ada perbedaan bermakna antara proporsi kesembuhan antara MT pada kelompok intervensi dengan kelompok kontrol ( $p=0,492$ ) (Tabel 2).

Gambar 2 (a dan b) memperlihatkan gambaran perkembangan penutupan lubang perforasi membran timpani marmot pada hari ke-0 dan hari ke-14. Perbandingan persentase luas area perforasi (PLAP) pada hari ke-0, 3, 7, 10 dan 14 diperlihatkan pada Gambar 3. Perbandingan PLAP antara kelompok intervensi dengan kelompok kontrol

memperlihatkan perforasi MT yang lebih besar pada kelompok kontrol pada hari ke-7 dan 10, yaitu sebesar 23,9 % dan 13,9 %, sedangkan pada kelompok intervensi adalah 21,2% dan 10,7% dengan uji statistik yang bermakna ( $p=0,023$  dan  $p=0,004$ ). Kemudian bila dibandingkan PLAP kelompok kontrol dengan kelompok intervensi pada hari ke-3 dan ke-14 ternyata tidak ada perbedaan bermakna dalam PLAP yaitu 31% dan 3,39 % vs 29% dan 2,1% dengan  $p=0,086$  dan  $p=0,375$ .

Bila dilihat dari tingkat penutupan perforasi (TPP) MT, ternyata ada perbedaan bermakna pada kelompok intervensi pada hari ke-3, 7, dan 10 dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi tidak ada perbedaan bermakna pada hari ke-14 (Tabel 3).



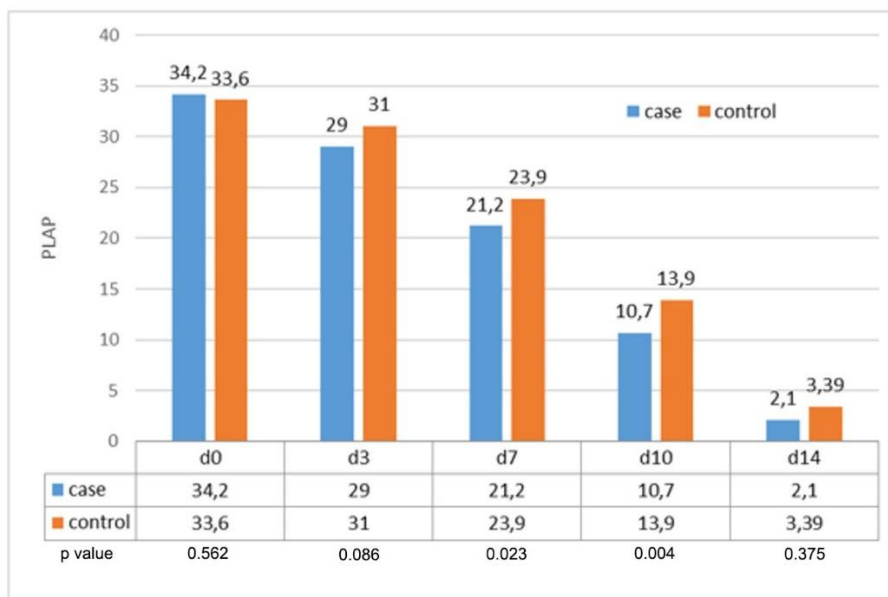
**Gambar 2.** Perkembangan penutupan lubang perforasi membran timpani marmot a. pada hari ke-0; b. pada hari ke-14

**Tabel 3.** Tingkat penutupan perforasi MT

Kelompok	Hari ke-3	Hari ke-7	Hari ke-10	Hari ke-14
<b>Intervensi</b>	0,15	0,38	0,69	0,94
<b>Kontrol</b>	0,08	0,29	0,58	0,9
<b>p</b>	0,010	0,003	0,001	0,417

*P= level of significance (T test)*

Tingkat penutupan perforasi: Selisih antara PLAP hari ke-0 dengan PLAP hari ke-3, 7, 10, dan 14 dibagi dengan PLAP hari ke-0



**Gambar 3.** Persentase luas area perforasi (PLAP) pada hari ke-0, 3, 7, 10, dan 14

## DISKUSI

Tidak seperti pada jaringan lain di tubuh manusia, MT memiliki mekanisme penyembuhan luka yang berbeda. MT tidak memiliki jaringan lain di bawahnya yang dapat menyediakan nutrisi untuk memperbaiki sel yang rusak, tetapi MT mempunyai kapasitas untuk memperbaiki dirinya sendiri. Beberapa penelitian memperlihatkan kemampuan perforasi MT untuk menutup secara spontan hampir 90-100% dalam waktu tujuh sampai 21 hari, tergantung dari luas dan area perforasi.<sup>5,16</sup> Hasil penelitian ini menunjukkan 52,9% (9/16) dari pada kelompok intervensi dan 47,1% (8/18) dari kelompok kontrol yang menutup sempurna pada hari ke-14. Ini menunjukkan hasil yang komparatif dengan penelitian yang lain bila dihubungkan dengan lamanya waktu observasi.

Pada penelitian ini, hasil rata-rata PLAP antara kelompok intervensi dan kelompok kontrol adalah kurang lebih sama sejak hari ke-0. Ini menunjukkan PLAP antara kelompok

intervensi dan kelompok kontrol memiliki lubang perforasi yang kurang lebih sama sejak awal penelitian, hal ini tentunya dapat menghindari bias terhadap ukuran perforasi yang dapat mempengaruhi hasil TPP.

Lapisan epitel MT pada dasarnya akan mengalami pergerakan secara terus menerus. Penelitian oleh Johnson, menunjukkan lapisan epitel akan bergerak dengan kecepatan 0.5-1mm per hari.<sup>17</sup> AR mungkin berperan dalam proses penutupan perforasi melalui percepatan migrasi epitel dengan cara akselerasi *turn-over rate* dari lapisan epitel tersebut.

Kelompok AR menunjukkan TPP yang signifikan pada hari ke-3,7 dan 10. Tetapi pada hari ke-14 efek AR menjadi tidak signifikan. Ini berarti pengaruh AR pada penutupan luka perforasi baru MT tidak berpengaruh setelah hari ke-14. Hal ini sesuai dengan hasil beberapa peneliti yang menunjukkan penutupan yang terjadi secara spontan dengan berjalannya waktu

Saat ini, belum ada penelitian yang menggunakan AR sebagai media untuk mempercepat penutupan perforasi MT. AR mungkin dapat menjadi salah satu pilihan yang dapat dipertimbangkan karena AR sangat murah, tersedia dan gampang diaplikasikan dalam praktek poli rawat jalan oleh dokter THT.

## SIMPULAN

Pemberian AR menunjukkan hasil TPP yang lebih baik pada hari ke-3,7 dan 10, tetapi tidak mempunyai efek setelah hari ke-14, karena baik kelompok intervensi dan kelompok kontrol memiliki kemungkinan yang sama untuk menutup secara spontan.

Kekurangan penelitian ini adalah tidak adanya pemeriksaan histopatologi yang dapat menilai efek dari AR pada MT dalam hal ketebalan epitel, reaksi fibroblas dan neovaskularisasi. Keterbatasan lainnya adalah penelitian ini dilakukan pada kondisi perforasi baru. Tentunya ini menjadi suatu pertanyaan mengenai manfaat AR bila diberikan pada perforasi yang subakut ataupun kronis. Limitasi yang lain adalah penelitian ini dilakukan oleh peneliti tunggal, sehingga sangat mungkin terjadi bias pada saat pencatatan dan analisa PLAP untuk kelompok intervensi dan kelompok kontrol. Penelitian lanjutan mungkin diperlukan untuk menilai efek AR terhadap pembentukan kolesteatoma pada kavum timpani dan efek ototoksisitas pada telinga bagian dalam.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Griffin WL. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical

practice. *Laryngoscope*. 1979; 89:261–82.

2. Valentine P, Wright T. Anatomy and embryology of the external and middle ear. In: Watkinson JC, Clarke RW, editors. *Scott-Brown's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 8th ed. Taylor & Francis Group, LLC; 2018. P. 525–43.
3. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol*. 1990;109(5–6):406–15.
4. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol*. 2004;124(10):1141–4.
5. De Araújo MM, Murashima AAB, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2014;80(4):330–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.05.014>
6. Gür ÖE, Ensari N, Öztürk MT, Boztepe OF, Gün T, Selçuk ÖT, et al. Use of a platelet-rich fibrin membrane to repair traumatic tympanic membrane perforations: a comparative study. *Acta Otolaryngol*. 2016;136(10):1017–23.
7. Lou ZC, Lou ZH, Xiao J. Regeneration of the tympanic membrane using fibroblast growth factor-2. *J Laryngol Otol*. 2018;132(6):470–8.
8. Gao T, Li X, Hu J, Ma W, Li J, Shao N, et al. Management of traumatic tympanic membrane perforation: A comparative study. *Ther Clin Risk Manag*. 2017;13:927–31.
9. Li X, Zhang H, Zhang Y. Repair of large traumatic tympanic membrane perforation using ofloxacin otic solution and gelatin sponge. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2022;88(1):9–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.03.007>
10. Polcz ME, Barbul A. The role of vitamin A in wound healing. *Nutr Clin Pract*. 2019;34(5):695–700.
11. Hwang PH, Chan JM. Retinoic acid improves ciliogenesis after surgery of the maxillary sinus in rabbits. *Laryngoscope*. 2006;116(7):1080–5.
12. Elson ML. The role of retinoids in wound healing. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(2 III):79–81.
13. Zinder R, Cooley R, Vlad LG, Molnar JA. Vitamin A and wound healing. *Nutr Clin Pract*. 2019;34(6):839–49.

14. Leyden J, Stein-Gold L, Weiss J. Why topical retinoids are mainstay of therapy for acne. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017;7(3):293–304.
15. Lee DH. Re: A randomised controlled trial comparing spontaneous healing, gelfoam patching, and edge-approximation plus gelfoam patching in traumatic tympanic membrane perforation with inverted or everted edges. *Clin Otolaryngol*. 2011; 36(4):399–400.
16. Amadasun JEO. An observational study of the management of traumatic tympanic membrane perforations. *J Laryngol Otol*. 2002;116(3):181–4.
17. Johnson A, Hawke M. The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane perforations in guinea-pig: a photographic study. *Acta Otolaryngol*. 1987;103(1–2):81–6.