

Chasya, et al., Pengaruh Pemberian Gel Doksisisiklin terhadap Jumlah Fibroblas pada

Pengaruh Pemberian Gel Doksisisiklin terhadap Jumlah Fibroblas pada Proses Penyembuhan Dermatitis Paederus akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) pada Mencit

(The Effect of Doxycycline Gel on The Number of Fibroblast in Paederus Dermatitis Healing Process due to Rove Beetle (Paederus sp.) in Mice)

Silvi Ahmada Chasya, Al Munawir, Erma Sulistyaningsih
Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: silvi.ahmada@yahoo.com

Abstract

Paederus dermatitis caused by rove beetle makes the tissue damage called dermonecrosis. The MMP on pederin toxins from the symbiosis of rove beetle (*Paederus* sp.) and *Pseudomonas aeruginosa* is supposed can delay the wound healing process. Doxycycline gel as a MMP inhibitor is believed can accelerate the healing process. The purpose of this study was to determine the effect of doxycycline gel on the healing process of *Paederus dermatitis* by observing the number of fibroblasts as an indicator. This study used 40 mice, were divided into four major groups, those were normal control group, the negative control, treatment groups with doxycycline gel 1% and 5%. Termination was performed on days 1, 3, 5, 7, and 15. Data was obtained by calculating the number of fibroblasts per field of view, then processed in ImageJ and tested statistically with comparison test of One Way Anova. The average number of fibroblasts per field of view in treatment groups was higher. The peak occurred on day 7 and decrease on day 15. It indicated that the topical administration of doxycycline gel on *Paederus dermatitis* can accelerate healing process, showed by the increasing in average number of fibroblasts per field of view.

Keywords: doxycycline gel, fibroblast, paederus dermatitis

Abstrak

Dermatitis paederus akibat racun kumbang tomcat (*Paederus* sp.) menyebabkan kerusakan jaringan yang disebut dengan dermonekrosis. Kandungan MMP pada racun pederin dari hasil simbiosis tomcat (*Paederus* sp.) dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diduga dapat memperlambat proses penyembuhan luka. Sifat MMP inhibitor pada gel doksisisiklin diduga mampu mempercepat proses penyembuhan penyakit ini. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh gel doksisisiklin terhadap proses penyembuhan dermatitis paederus dengan indikator jumlah fibroblas. Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit yang terbagi dalam 4 kelompok: kontrol normal, kontrol negatif, perlakuan dengan gel doksisisiklin 1% dan perlakuan dengan doksisisiklin 5%. Terminasi dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, 7, dan 15 dengan jumlah 8 ekor per hari terminasi. Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan menghitung jumlah fibroblas per lapang pandang kemudian diolah dengan software imageJ. Uji statistik dilakukan menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata jumlah fibroblas per lapang pandang lebih besar pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol negatif. Puncaknya terjadi pada hari ke-7 dan menurun pada hari ke-15. Hal ini menandakan bahwa pemberian topikal gel doksisisiklin pada dermatitis paederus dapat mempercepat penyembuhan dengan indikator peningkatan rata-rata jumlah fibroblas.

Kata kunci: gel doksisisiklin, fibroblas, dermatitis paederus

Pendahuluan

Kerusakan jaringan kulit atau yang disebut dengan dermonekrosis dapat terjadi pada dermatitis paederus akibat kontak dengan racun pederin yang dihasilkan oleh kumbang tomcat (*Paederus* sp.). Gejala yang timbul berupa rasa gatal, merah, dan melepuh seperti terbakar. Etiologi terbanyak dermatitis paederus di Indonesia adalah *Paederus peregrinus* [1]. Beberapa kasus yang dilaporkan di antaranya 260 warga Tulungagung, 50 warga Gresik, dan 160 warga Surabaya yang mengalami serangan kumbang tomcat [2].

Racun pederin berasal dari hasil simbiosis antara kumbang tomcat dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang mampu mensekresikan enzim matriks metalloproteinase (MMP) [3,4]. Beberapa jenis MMP yang berperan di jaringan kulit adalah MMP-2 dan MMP-9 yang mampu mendegradasi komponen matriks ekstraseluler kulit seperti kolagen, gelatin, dan elastin. Adanya aktifitas MMP ini memungkinkan terjadinya perlambatan pada proses penyembuhan dermatitis paederus.

Sebagaimana luka pada umumnya, penyembuhan dermatitis paederus terbagi menjadi tiga fase, yakni fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling dimana pada setiap fase mempunyai tanda sel khas yang mendominasi [5]. Fibroblas merupakan sel yang menjadi tanda pada fase proliferasi dan mampu memproduksi matriks ekstraseluler saat terjadinya jejas sehingga sel ini dapat menjadi salah satu indikator proses penyembuhan luka.

Doksisisiklin merupakan salah satu jenis antibiotik golongan tetrasiklin yang mempunyai sifat MMP inhibitor. Obat ini mampu berikatan dengan ion Ca^{2+} yang dibutuhkan enzim MMP untuk menjadi aktif sehingga menyebabkan enzim tidak berfungsi [6,7]. Sediaan doksisisiklin di pasaran adalah dalam bentuk oral. Namun, obat ini berpotensi untuk dibentuk menjadi sediaan topikal dalam pengobatan dermatitis paederus, yakni dalam bentuk gel. Bentuk sediaan ini dipilih atas dasar kelarutan obat dan jenis luka dermatitis paederus.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian gel doksisisiklin terhadap jumlah fibroblas pada proses penyembuhan dermatitis paederus akibat racun kumbang tomcat (*Paederus* sp.).

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan percobaan eksperimental menggunakan hewan coba berupa 40 ekor mencit albino jantan dengan berat antara 16-20 gram. Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok yakni kontrol normal, kontrol negatif yang hanya diinduksi racun pederin 500 ul, kelompok perlakuan A dengan 500 ul racun pederin dan gel doksisisiklin 1%, serta kelompok perlakuan B dengan 500 ul racun pederin dan gel doksisisiklin 5%. Pemberian gel doksisisiklin dilakukan 12 jam setelah induksi racun dan diulang 2x sehari. Terdapat 5 subkelompok sesuai dengan hari pengamatan yakni hari ke-1, 3, 5, 7, dan 15 sehingga 8 ekor mencit diterminasi per hari pengamatan.

Kumbang tomcat didapatkan dari area persawahan Antirogo Jember yang untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan mortar. Lima ekor tomcat dilarutkan dengan 1 mL aquadest, kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan mortar. Suspensi kemudian disentrifuge 5000 rpm selama 5 menit dan diambil bagian supernatan. Induksi dermatitis paederus dilakukan dengan memberikan racun pederin sebanyak 500 ul pada daerah cukuran di punggung mencit, diteteskan pelan-pelan kemudian diratakan.

Pembuatan sediaan histopatologi diambil dari bagian tengah luka karena proses dermonekrosis berpusat pada tengah luka. Pewarnaan dengan Hematoksin dan Eosin (HE) dan diamati pada pembesaran 400x. Lapang pandang dipilih dengan metode zig-zag dan dianalisis menggunakan software imageJ untuk menghitung jumlah fibroblas per lapang pandang. Hasil dari perhitungan ini kemudian dirata-rata.

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan Shapiro-Wilk untuk uji normalitas, Levene untuk uji homogenitas dan dilanjutkan dengan One Way Anova dengan tingkat kepercayaan 95% yang dilanjutkan dengan uji LSD. Data yang tidak normal dan atau tidak homogen, diuji dengan Kruskal Wallis.

Hasil Penelitian

Berikut data yang diperoleh, berupa rata-rata jumlah fibroblas per lapang pandang yang disajikan pada tabel 1.

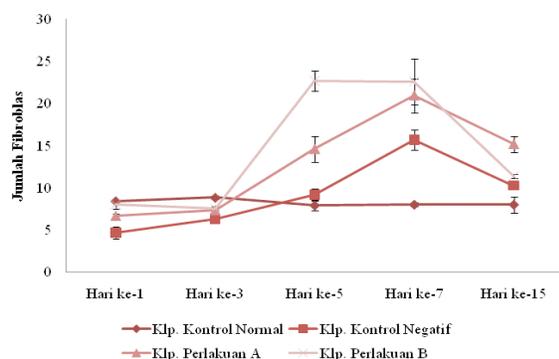
Tabel 1. Nilai Rata-Rata Jumlah Sel Fibroblas

(per lapang pandang)

Pengamatan	Kontrol Normal	Kontrol Negatif	Perlakuan A	Perlakuan B
Hari ke-1	8,42±0,12	4,67±0,71	6,67±0,23	8,00±0,47
Hari ke-3	8,83±0,23	6,33	7,33±0,23	7,50±0,24
Hari ke-5	7,92±0,59	9,17±0,71	14,58±1,53	22,67±1,18
Hari ke-7	8,00±0,24	15,67±1,18	20,92±2,00	22,58± 2,71
Hari ke-15	8,00±0,95	10,25±0,36	15,17±0,94	11,33±0,23

Jumlah rata-rata sel fibroblas terkecil terdapat pada kelompok kontrol negatif yang diterminasi pada hari ke-1 sedangkan jumlah rata-rata sel fibroblas tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan B hari ke-5. Secara umum pada kelompok perlakuan, jumlah rata-rata sel fibroblas lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif. Kelompok perlakuan A mencapai nilai tertinggi pada hari ke-7 dan menurun pada pengamatan hari ke-15 sedangkan kelompok perlakuan B mencapai nilai tertinggi pada hari ke-5, sedikit menurun pada hari ke-7 dan sangat menurun pada hari ke-15 (gambar 1).

Dari hasil uji statistik, semua data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Untuk uji homogenitas, pengamatan hari ke-1, 5, 7, dan 15 menunjukkan data yang homogen, sedangkan pengamatan hari ke-3 memerlukan transformasi data namun hasilnya tetap tidak homogen. Analisis dilanjutkan dengan uji One Way Anova untuk pengamatan hari ke-1, 5, 7, 15, dan dilanjutkan dengan uji LSD. Untuk pengamatan hari ke-3 dilakukan uji Kruskal Wallis.



Gambar 1. Grafik Perubahan Rata-Rata Jumlah Sel Fibroblas

Terdapat perbedaan rata-rata jumlah fibroblas yang bermakna antara kelompok kontrol normal dan kontrol negatif pada pengamatan hari ke-1. Selain itu, data yang juga beda bermakna adalah antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan B. Sedangkan pada pengamatan hari ke-5, yang berbeda bermakna adalah antara kontrol normal dengan perlakuan A, kontrol normal dengan perlakuan B, kontrol negatif dengan perlakuan A, dan kontrol negatif dengan perlakuan B. Untuk pengamatan hari ke-7, hampir semua kelompok berbeda bermakna kecuali perlakuan A terhadap perlakuan B. Pengamatan hari ke-15 menunjukkan data berbeda bermakna antara kelompok kontrol normal dengan perlakuan A, kontrol normal dengan perlakuan B, kontrol negatif dengan perlakuan A, dan perlakuan A dengan perlakuan B. Untuk data pengamatan hari ke-3 dilakukan uji Kruskal Wallis. Hasilnya adalah nilai signifikansinya 0,256 ($p > 0,05$), artinya data pengamatan hari ke-3 secara umum tidak berbeda.

Pembahasan

Sesaat setelah terjadinya jejas atau luka, proses penyembuhan akan terjadi yang diawali dengan terbentuknya bekuan darah pada permukaan luka. Setelah itu, terjadilah reaksi peradangan. Pada tahap inflamasi, sel-sel radang khususnya makrofag mulai memasuki bekuan darah dan mulai menghancurkannya [8]. Setelah 2-3 hari pasca terjadinya luka, terjadi pembentukan jaringan granulasi. Jaringan granulasi ini ditandai dengan proliferasi fibroblas dan kapiler baru yang halus dan berdinding tipis [9].

Secara keseluruhan, kelompok kontrol normal menunjukkan adanya sel fibroblas dengan rata-rata 8,23. Pada jaringan normal, sel fibroblas cukup jarang ditemukan dan biasanya bersembunyi di matriks jaringan penunjang. Jaringan normal mengandung sel fibroblas yang berfungsi untuk mempertahankan integritas jaringan. Jumlahnya dapat menurun ketika terjadi jejas pada jaringan. Fibroblas akan aktif bergerak dari jaringan sekitar luka ke daerah luka, kemudian akan berkembang (proliferasi) serta mengeluarkan beberapa substansi (kolagen, elastin, fibronectin, dan proteoglikan) yang berperan dalam rekonstruksi jaringan baru [10]. Sebagaimana yang terjadi pada hasil pengamatan hari ke-1, jumlah sel fibroblas kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan lebih rendah dibanding kontrol normal

dan terdapat peningkatan jumlah fibroblas pada kelompok perlakuan dibanding kontrol negatif. Hal ini dimungkinkan karena aktifitas penghambatan MMP oleh gel doksisisiklin sudah mulai berjalan sehingga degradasi matriks ekstraseluler dapat ditekan.

Pada pengamatan hari ke-3, jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan mengalami peningkatan jika dibanding hari ke-1. Hal ini sesuai dengan teori fibroplasia pada penyembuhan luka bahwa pada hari ketiga sejumlah fibroblas muda terlokalisasi pada daerah jejas [11] dan teori bahwa fibroblas aktif berproliferasi mulai pada hari ke-3 sampai hari ke-7 setelah jejas [12]. Namun, secara keseluruhan tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antar kelompoknya. Terdapat beberapa faktor pertumbuhan yang menstimulasi proliferasi fibroblas, meliputi *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), dan *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β) [9].

Dealey (1994) menjelaskan bahwa proses inflamasi pada luka, dapat diperpanjang akibat adanya iritasi dan infeksi [13]. Hal ini sesuai dengan dugaan peneliti bahwa aktifitas MMP pada racun pederin yang menimbulkan dermonekrosis dapat memperlambat proses penyembuhan. Selain itu, adanya peran bakteri *Pseudomonas aeruginosa* juga dapat menimbulkan infeksi yang menjadi salah satu penyebab memanjangnya masa inflamasi. Fenomena ini dapat dilihat pada pengamatan hari ke-5 dan ke-7. Namun, fenomena ini dapat diatasi dengan gel doksisisiklin yang diberikan pada kelompok perlakuan sehingga aktifitas fibroblas dapat berjalan dengan optimal yang dianalogikan dengan jumlah fibroblas yang tinggi. Nilai lebih dari doksisisiklin adalah perannya sebagai antibiotik bakteriostatik yang dapat menghambat aktifitas bakteri dengan cara mengganggu sintesis ribosom 30s bakteri [14]. Namun dalam penelitian ini aktifitas antibakteri tidak diteliti.

Pada hari ke-15, semua kelompok (kecuali kontrol normal) mengalami penurunan jumlah fibroblas mendekati nilai kelompok kontrol normal. Secara alami, jumlah fibroblas akan menurun kemudian menghilang setelah daerah luka terpenuhi oleh serat kolagen. Penurunan jumlah fibroblas ini penting dan harus terjadi untuk mencegah terjadinya kelainan fibrosis seperti pada parut hipertrofik [15].

Sampai saat ini, sediaan doksisisiklin di pasaran adalah dalam bentuk oral.

Sebagaimana mayoritas pengobatan pada penyakit kulit, peneliti menganggap bahwa doksisisiklin topikal berpotensi sebagai modalitas terapi yang cocok untuk dermatitis paederus. Dengan pertimbangan sifat kelarutannya yang tinggi pada air, peneliti memilih sediaan topikal dalam bentuk gel. Selain itu, sifat luka pada dermatitis paederus adalah luka kering sehingga cocok untuk gel yang membuat suasana *moist* pada luka. Namun, perlu penelitian lebih lanjut mengenai farmakokinetik dari sediaan gel doksisisiklin ini.

Dalam penelitian ini, gel doksisisiklin terbukti berpengaruh pada proses penyembuhan dermatitis paederus terutama pada perubahan jumlah fibroblas sehingga sesuai dengan hipotesis peneliti. Dengan sifatnya sebagai MMP inhibitor, gel doksisisiklin mampu mengikat ion Ca^{2+} yang dibutuhkan untuk mengaktifkan enzim MMP [7]. Perbedaan konsentrasi gel doksisisiklin pada perlakuan A dan B tidak menunjukkan nilai beda yang bermakna pada hari ke-1, 3, 5, dan 7. Hal ini dapat diartikan rentang konsentrasi yang digunakan masih sempit. Namun, secara umum, konsentrasi yang menunjukkan aktifitas lebih baik adalah gel doksisisiklin 5% pada perlakuan B.

Beberapa hal yang menjadi kelemahan dari penelitian ini adalah kurang bisa dikontrolnya sterilitas luka sehingga ada kemungkinan infeksi sekunder pada daerah luka. Namun, hal ini bisa diatasi juga dengan gel doksisisiklin dengan sifatnya sebagai antibiotik. Kelemahan lain adalah kurangnya kontrol pada saat pembuatan sediaan histopatologi sehingga ada kemungkinan sudut pemotongan jaringan yang sedikit berbeda. Peneliti sudah melakukan pengontrolan dengan membatasi pemotongan pada daerah tengah luka dengan arah potong vertikal. Kelemahan yang terakhir adalah jumlah sampel yang masih memungkinkan adanya bias sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan penambahan jumlah sampel.

Simpulan dan Saran

Gel doksisisiklin berpengaruh terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada proses penyembuhan dermatitis paederus akibat racun kumbang tomcat (*Paederus* sp.) secara *in vivo* dengan perbedaan bermakna pada hari ke-1, 5, 7, dan 15 ($p < 0,05$).

Dari hasil penelitian yang diperoleh, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis dan lama pemberian gel doksisisiklin yang efektif

pada proses penyembuhan dermatitis dan dengan jumlah sampel yang lebih besar.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah membiayai penelitian ini dalam Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) tahun 2015.

Daftar Pustaka

- [1] Singh G, Ali YA. Paederus Dermatitis. India: Indian J Dermatol Venerol Leprol; 2007.
- [2] Kompas [Internet]. 2002 [cited 2013 Sep 27]. Available from : Tomcat.http://teknokompas.com/read/2012/03/21/14044489/tercatat.130.laporan.serangan.tomcat
- [3] Piel, Jörn. A polyketide Synthase-peptide Synthetase Gene Cluster from An Uncultured Bacterial Symbiont of *Paederus* Beetles. 2002. *PNAS*,99 (22): 14002-14007.
- [4] Asoodeh A, Musaabadi HM. Purification and Characterization of a Thermostable Neutrophilic Metalloprotease from *Pseudomonas* sp. DR89.*Iranian J Biotech* 2012; 10(2): 120-128.
- [5] Hidayat TSN. "Peran Gel Ekstrak Aloe Vera pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat Dalam pada Tikus".Tidak diterbitkan.Karya Akhir. Surabaya: Departemen/SMF Ilmu Bedah Plastik Rekonstruksi dan Estetik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo. 2013.
- [6] Katzung BG. Farmakologi Dasar & Klinik. Jakarta: EGC; 2007.
- [7] Kristanti RA. Penggunaan Doksisisiklin Hyclate Sebagai Inhibitor Matriks Metalloproteinase Pada Terapi Tambahan Periodontis.*SAINSTIS*,2013;1 (2).
- [8] Price SA, Lmc Wilson. *Pathophysiology Clinical Concept of Disease Process 6th Edition*. Disadur Anugerah, P. Jakarta: EGC. 2005.
- [9] Robbins SL, Kumar V. Buku Ajar Patologi. Jakarta: EGC; 2007.
- [10] Mitchell, Kumar, Abbas, Fausto. *Buku Saku Dasar Patologis Penyakit Edisi 7*. Alih Bahasa oleh Andy Hartono. Jakarta: EGC. 2008.
- [11] Newman MG, Takei HH, Carranza FA. *Caranza: Clinical Periodontology 9th Edition*. Philadelphia: W.B. Saunders. 2002.
- [12] Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. Cina: Mosby, Elsevier. 2008. Pp: 64-74, 379-390.
- [13] Dealey C. The Care of Wound. Blackwell Science. USA. 1994.
- [14] Wabster, C. *Clinical Pharmacology*. USA: Teton New Media. 2001.
- [15] Gurtner GC. Wound healing, normal and abnormal. In: Thorne CH, Beasley, R.W., Aston, S.J., Bartlett, S.P., Gurtner, G.C., Spear, S.L. (Eds). *Grabb and Smith's plastic surgery*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2007;15-22.