



Original Article

Pengaruh Pemberian Fenitoin Oral dan Vitamin C Oral terhadap Jumlah Kolagen dan Diameter pada Fistula Enterokutan Tikus Wistar

Gede Pambudi Utomo¹, Ignatius Riwanto^{2,3}, Trilaksana Nugroho²

¹Program Studi Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Indonesia

²Sub Bagian Bedah Digestive Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi/
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Indonesia

³Program Studi Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/
Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi Semarang, Indonesia

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v9i3.766>

Diajukan: 04 Juli 2022
Diterima: 10 Agustus 2022

Afiliasi Penulis:
Program Studi Ilmu Bedah
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
Semarang, Indonesia

Korespondensi Penulis:
Gede Pambudi Utomo
Jalan Dr. Sutomo 16, Semarang
Jawa Tengah 50244, Indonesia

E-mail:
gedepambudi@rocketmail.com

Latar belakang : *Enterocutaneous fistula* (ECF) adalah salah satu tantangan bagi banyak ahli bedah di dunia. Meskipun terdapat perkembangan dalam perawatan medis dan tehnik operasi, namun morbiditas dan mortalitas terkait ECF masih tinggi. Keberhasilan dalam tatalaksana ECF memerlukan perawatan yang komprehensif dan sumber daya yang mahal, dimana tidak terjangkau oleh sebagian masyarakat Indonesia. Fenitoin dan Vitamin C adalah obat yang murah dan telah menunjukkan manfaat baik dalam penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian fenitoin dan vitamin C akan meningkatkan kolagenisasi dan menurunkan diameter ECF pada tikus wistar. Kemudian untuk mengevaluasi apakah pemberian kombinasi fenitoin dan vitamin C memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan pemberian tunggal fenitoin atau vitamin C.

Metode : Peneliti membuat *caecostoma* sebagai model ECF pada 24 ekor tikus. Tikus kemudian dibagi menjadi empat kelompok perlakuan dengan : perawatan NaCl, Kombinasi fenitoin-vitamin C, Fenitoin saja dan Vitamin C saja. Pengamatan hasil dilakukan pada hari ke-7 dengan mengamati deposisi kolagen dan mengukur diameter ECF.

Hasil : Penelitian ini menunjukkan perbedaan kolagenisasi dan penurunan diameter ECF bermakna secara statistik ($p < 0,05$) pada tiap kelompok perlakuan jika dibandingkan kelompok kontrol ($5,521 \pm 2,552$ %; $9,395 \pm 0,582$ mm). Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa pemberian kombinasi fenitoin dengan vitamin C ($28,110 \pm 6,535$ %; $5,742 \pm 0,394$ mm) memberikan hasil yang lebih baik ($p < 0,05$) dibanding pemberian tunggal fenitoin ($15,448 \pm 5,184$ %; $8,101 \pm 0,822$ mm) atau vitamin C ($19,118 \pm 4,190$ %; $6,883 \pm 0,744$ mm).

Simpulan : Kami menyimpulkan baik fenitoin maupun vitamin C memiliki efek baik dalam penyembuhan ECF. Pemberian kombinasi Fenitoin dan vitamin C terbukti lebih bermanfaat dibandingkan pemberian tunggal.

Kata kunci : *Enterocutaneous fistula*, Fenitoin, Vitamin C, kolagen, Diameter fistula

Effect Phenytoin and Vitamin C Therapy to Collagen Deposition and Diameter of Enterocutaneous Fistula in Wistar Rat

Abstract

Background : Enterocutaneous fistule (ECF) is one of the most challanging problem for many surgeon across the world. Despite advancements in medical treatment and surgical technique, the morbidity and mortality asociated with ECF remains high. Success in managing ECF need comprehensive treatment and expensive resources, that many people in Indonesia couldn't afford. Phenytoin and Vitamin C are medications which is not only cheap but also has been shown positive effect on wound healing. The aim of this study was to determine, whether phenytoin and vitamin C administration would increase collagen deposition and reduce the diameter of ECF in wistar rats. Furthermore to evaluate whether combining phenytoin with vitamin C would give better result in ECF healing compared to phenytoin or vitamin Calone.

Methods : We made caecostoma as the ECF model on 24 rats. The rats were divided into four groups: normal saline-treated, phenytoin-vitamin C combined, phenytoin only and vitamin C only group. The results were observed on day 7th, by assessing the collagen deposition and macroscopically by meassuring diameter of the fistule.

Results : This study showed significant ($p < 0.05$) increase in collagenation and reduction of ECF diameter in all treatment group compared to normal saline-treated group (5.521 ± 2.552 %; 9.395 ± 0.582 mm). This study also revealed that, combination of phenytoin-vitamin C (28.110 ± 6.535 %; 5.742 ± 0.394 mm) gave better result ($p < 0.05$) compared to phenytoin (15.448 ± 5.184 %; 8.101 ± 0.822 mm) or vitamin C (19.118 ± 4.190 %; 6.883 ± 0.744 mm) alone.

Conclusion : We conclude that both phenytoin and vitamin C show positive effect on ECF healing. The combination of phenytoin and vitamin C appears to be more beneficial than single administration.

Keywords : Enterocutaneous fistule, Phenytoin, Vitamin C, Collagen, Fistule diameter

PENDAHULUAN

Fistula enterokutan atau *Enterocutaneous fistula* (ECF) adalah suatu keadaan adanya hubungan yang tidak normal antara traktus gastrointestinal (GI) intraabdomen dengan kulit.¹⁻³ ECF masih menjadi momok yang menakutkan bagi ahli bedah di dunia hingga saat ini.^{1,4} Hal ini karena sebanyak 75% dari semua kejadian ECF adalah akibat langsung dari operasi laparotomi atau laparotomi (iatrogenik), Sedangkan etiologi ECF dari proses penyakit seperti radang usus, patologi divertikular, trauma, radiasi dan keganasan hanya berkisar 25% dari semua kejadian ECF.^{2,3,5,6} 90% pasien ECF akan mengalami morbiditas mulai dari eksoriasi kulit, dehidrasi, hingga sepsis. Mortalitas yang disebabkan oleh ECF berkisar antara 5-20% dan tergantung pada sejumlah faktor seperti infeksi dan karakteristik fistula.^{2,7} Angka kematian untuk sebagian besar prosedur bedah elektif kurang dari 2%, namun pada pasien dengan ECF angka kematian meningkat hingga berkisar dari 6% hingga 48%.^{6,7} ECF juga meningkatkan beban keuangan dengan menambah panjang hari rawat rumah sakit dan unit perawatan intensif.^{2,8}

Tatalaksana ECF masih menjadi tantangan bagi dunia kedokteran. Keberhasilan dalam manajemen ECF membutuhkan pendekatan multidisiplin.^{1,6} Dengan penanganan yang komprehensif, disebutkan bahwa tingkat penutupan spontan ECF dengan manajemen konservatif adalah mulai dari 5-20%, sedangkan angka penutupan ECF dengan tindakan operatif berkisar antara

75-85%.^{1,8} Terapi konservatif yang dilakukan antara lain, resusitasi cairan, kontrol sepsis, terapi nutrisi dan elektrolit, kontrol *output*, serta perawatan luka dan kulit.^{1,2}

Metode yang perawatan luka yang terbukti bermanfaat dalam mengurangi *output* ECF dan meningkatkan penutupan spontan ECF adalah menggunakan *negative pressure wound therapies* (NPWT) atau yang sering dikenal *vacuum assisted closure* (VAC).^{3,9} Penggunaan VAC selama 7 hari telah terbukti efektif menurunkan *output* ECF pada 98% pada pasien yang diteliti. VAC juga terbukti melindungi kulit sekitar fistula agar tidak terjadi kontak dengan effluent sehingga mencegah terjadinya maserasi kulit.⁹ Penelitian menunjukkan bahwa penggunaan VAC akan menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi dan *matrix metalloproteinase* (MMPs) yang berperan dalam mendegradasi kolagen.¹⁰⁻¹² Namun, penggunaan VAC memerlukan sumber daya yang besar sehingga aplikasinya sulit diterapkan di rumah sakit dengan fasilitas yang kurang dan perekonomian masyarakat yang rendah.

Salah satu bahan yang banyak diteliti sebagai bahan penyembuhan luka adalah fenitoin. Fenitoin (diphenylhydantoin) mulai diperkenalkan pada tahun 1937 sebagai terapi kejang yang terbukti efektif dan masih digunakan sampai saat ini. Efek stimulasi fenitoin terhadap pertumbuhan jaringan ikat pada ginggiva menunjukkan kemungkinan untuk digunakan dalam penyembuhan luka.^{13,14} Beberapa mekanisme kerja fenitoin yang diketahui dapat mendukung terjadinya

penyembuhan luka antara lain adalah stimulasi proliferasi dari fibroblas, meningkatkan angiogenesis, meningkatkan pembentukan jaringan granulasi, antagonis glukokortikoid, menurunkan aktifitas kolagenase, peningkatan deposit kolagen, penurunan eksudat pada luka serta ditemukan pula adanya efek antibakteri.¹⁵⁻¹⁷ Jaber *et al* mengamati manfaat fenitoin intravena dalam mengobati fistula gastrointestinal.^{16,18} Penelitian lain menenunjukkan, pemberian fenitoin sistemik pada pasien ECF akan menurunkan aliran efluen serta menurunkan ukuran fistula.^{19,20} Pada pasien dengan *high output* ECF, direkomendasikan untuk mendapat terapi tambahan zinc dengan dosis ditingkatkan hingga 50%, dan vitamin C dengan dosis ditingkatkan hingga 5-10 kali dosis normal. Suplementasi vitamin C pada beberapa penelitian terbukti mempercepat proses penyembuhan luka.^{5,21,22} Valsangkar *et al* menyebutkan bahwa pada penelitiannya angka kejadian fistula yang terjadi pada populasi kekurangan vitamin C adalah 60%.²³

Tujuan akhir keberhasilan terapi adalah penutupan spontan ECF. Uraian di atas telah menjelaskan bahwa vitamin C telah terbukti membantu penyembuhan ECF lewat perannya dalam pembentukan jaringan fibrosa dan kolagen, sedangkan fenitoin juga telah terbukti membantu percepatan penutupan fistula, melalui perannya sebagai anti kolagenase yang mencegah degradasi fibroblast maupun kolagen. Kombinasi vitamin C yang merangsang terbentuknya kolagen dikombinasikan dengan fenitoin sebagai anti kolagenase, diduga akan mempercepat penyembuhan ECF dibandingkan dengan hanya pemberian vitamin C atau fenitoin saja. Mekanisme tersebut menjadi dasar bagi peneliti untuk meneliti kombinasi pemakaian vitamin C dan fenitoin dibandingkan hanya vitamin C atau fenitoin saja dengan mengamati diameter ECF dan jumlah kolagen sebagai marker kesembuhan ECF.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *Randomized Controlled trial with post test only group design*. Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok, kelompok kontrol yang mendapat perawatan luka (kassa lembab-kering), Perlakuan 1 yang mendapatkan perawatan luka dan terapi kombinasi fenitoin-vitamin C oral, Perlakuan 2 yang mendapatkan perawatan luka dan terapi fenitoin oral, Perlakuan 3 yang mendapatkan perawatan luka dan terapi vitamin C oral. Peneliti memberikan perlakuan secara sonde satu kali sehari dengan dosis fenitoin 0,01 mg/grBB dan dosis vitamin C 0,09 mg/grBB.

Penelitian dilakukan di laboratorium Bioscience Universitas Brawijaya Malang, menggunakan 24 ekor tikus jantan dari galur wistar. Tikus yang digunakan berusia 8-10 minggu, dengan berat badan 150-200 gram

dan tidak memiliki kelainan anatomis. Jika selama perlakuan tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif) atau mengalami penurunan berat badan > 10% atau tikus mati saat penelitian maka akan dieksklusi dari penelitian. Pembagian kelompok dilakukan secara random dengan pengambilan undian, dengan pembagian pada tiap kelompok sebanyak 6 ekor sesuai ketentuan besar sampel menurut WHO. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang individual dengan siklus gelap-terang 12 jam dan diberi makanan dan minuman secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan, Ijin etik hewan coba pada penelitian ini telah disetujui komisi etik. Tikus menjalani masa aklimatisasi selama 1 minggu. Setelah aklimatisasi, tikus dilakukan prosedur pembuatan fistula enterokutan dengan prosedur Bultmann *et al*²⁴, kemudian dilanjutkan perlakuan.

Pada hari ke-7, akan dilakukan terminasi hewan coba sekaligus pengambilan data. Pengukuran diameter fistula dilakukan pada dua titik, di tepi batas luka, selanjutnya kedua titik difoto, kemudian pengukuran menggunakan *software ImageJ* untuk mendapatkan ukuran yang akurat. Data pengamatan histopathologi jumlah seluruh tipe kolagen yang didapatkan dengan dengan pewarnaan *Sirius red* dengan *Picrosirius red* kemudian diukur dengan persentase area fraksi menggunakan aplikasi *imageJ*.

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Seluruh hasil dinilai dengan rerata \pm standar deviasi. Setelah dilakukan uji normalitas (*Saphiro Wilk*) dan homogenitas (*Lavene Static*), pengujian rerata pada penelitian ini menggunakan uji *One Way Anova*, dilanjutkan dengan *Post-Hoc Test* untuk menilai perbedaan antar kelompok. Hasil dikatakan bermakna apabila $p > 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan tidak melewati angka 1. Analisa data dilakukan menggunakan SPSS versi 25 *for Windows*.

HASIL

Analisis Deskriptif Jumlah kolagen

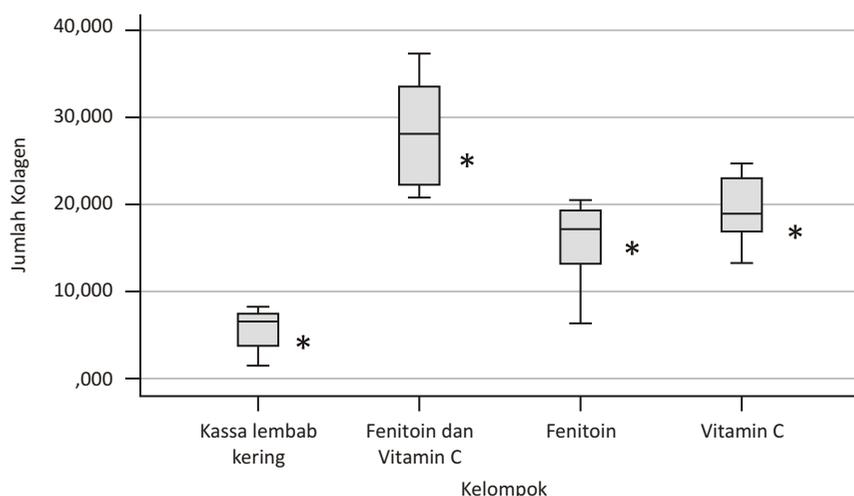
Jumlah kolagen yang terbentuk pada jaringan fistula enterokutan diamati dengan dilakukan pengecatan *sirius red*. Pengukuran jumlah kolagen yang terbentuk dilakukan dengan menilai presentase area fraksi menggunakan aplikasi *imageJ*. Data rata-rata jumlah kolagen pada jaringan fistula enterokutan pada tiap kelompok dapat diamati pada Tabel 1.

Dari tabel 1, kita dapat mengamati rata-rata area fraksi kolagen terbanyak adalah pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan terapi kombinasi fenitoin dan vitamin C yaitu sebesar $28,110 \pm 6,535$. Sedangkan rata-rata area fraksi kolagen yang paling kecil terdapat pada kelompok kontrol yang mendapatkan perawatan luka dengan kassa lembab-kering yaitu sebesar $5,521 \pm 2,552$. Dari hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan data berdistribusi normal

TABEL 1
Analisis deskriptif, uji normalitas dan homogenitas jumlah kolagen

Kelompok	Mean ± SD	Median (Min–Max)	P (Shapiro–Wilk)	Homogeneity test
K (Kassa lembab – kering)	5,521 ± 2,552	6,372 (1,376–8,037)	0,420*	
P1 (Fenitoin + Vitamin C)	28,110 ± 6,535	27,941 (20,426–37,062)	0,757*	0,128**
P2 (Fenitoin)	15,448 ± 5,184	16,947 (6,329–20,341)	0,334*	
P3 (Vitamin C)	19,118 ± 4,190	18,763 (13,133–24,491)	0,925*	

Keterangan: *Distribusi normal ($p > 0,05$); ** Homogen ($p > 0,05$)



Gambar 1. Grafik boxplot dari jumlah kolagen fistula enterokutan dari tiap kelompok.

K: perawatan luka fistula dengan kassa lembab , P1: perawatan luka fistula dengan kombinasi fenitoin oral dan vitamin C oral, P2: perawatan luka fistula dengan fenitoin oral (P2), P3: perawatan luka fistula dengan vitamin C oral (P3). Terdapat perbedaan bermakna secara statistik (*One Way ANOVA* $P < 0,05$). Serta didapatkan pula perbedaan bermakna pada tiap kelompok perlakuan jika dibandingkan kelompok kontrol; * signifikan $P < 0,05$

($p > 0,05$) dan dari uji homogenitas data diperoleh nilai $> 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang diperoleh adalah homogen.

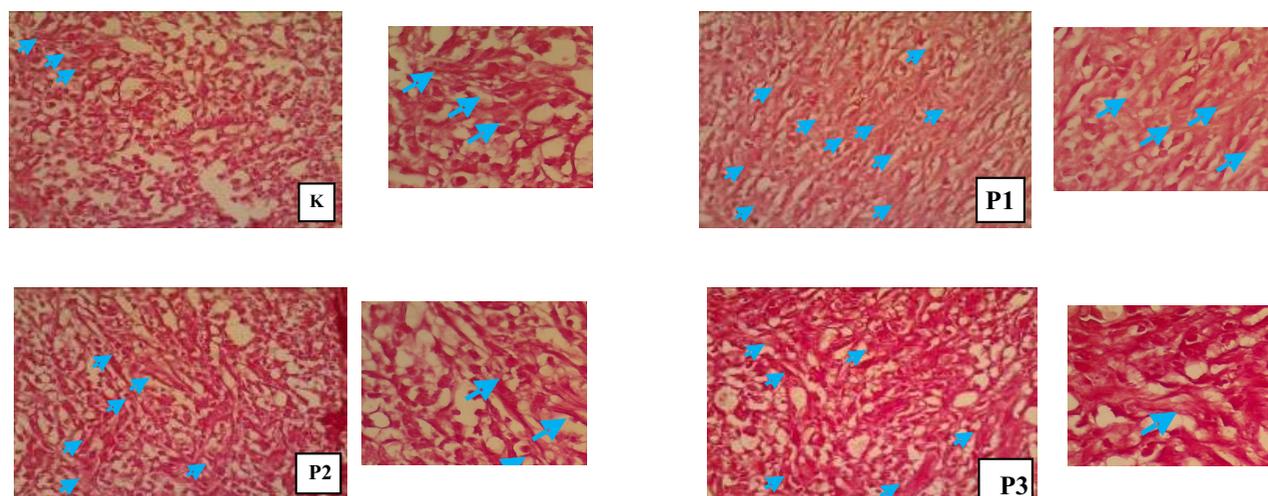
Uji Statistik Jumlah Kolagen

Pemeriksaan jumlah kolagen di hari ke-7 memberikan hasil yang berbeda untuk pada tiap kelompok. Jumlah area fraksi kolagen terbesar terbanyak didapatkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang mendapatkan terapi kombinasi fenitoin dan vitamin C yaitu sebesar 27,941 (20,426 – 37,062). Sedangkan jumlah area fraksi kolagen terkecil didapatkan pada kelompok kontrol yang hanya mendapatkan perawatan luka dengan kassa lembab-kering dengan median sebesar 6,372 (1,376 – 8,037). Pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang mendapat fenitoin oral

didapatkan median jumlah area fraksi kolagen adalah 16,947 (6,329 – 20,341), sedangkan jumlah area fraksi kolagen untuk kelompok perlakuan 3 (P3) yang mendapat terapi vitamin C adalah sebesar 18,763 (13,133 – 24,491).

Analisis statistik yang dilakukan dengan uji *One Way Anova* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,0001 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata jumlah kolagen fistula enterokutan berbeda secara signifikan. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk menguji beda antar kelompok.

Dari uji *Post Hoc* didapatkan perbandingan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Hasil uji tersebut menunjukkan peningkatan jumlah kolagen yang



Gambar 2. Gambaran serat kolagen pada preparat histologi jaringan fistula enterokutan dengan pembesaran 100x. Tampak kolagenisasi yang lebih meningkat pada kelompok yang mendapatkan kombinasi fenitoin dan vitamin C (P1) disusul kelompok yang mendapat vitamin C (P2) dan fenitoin (P3). Preparat histologi dibuat dengan pengecatan *sirius red*.

lebih besar pada pemberian terapi fenitoin dan vitamin C baik diberikan secara sendiri-sendiri maupun secara kombinasi dibandingkan dengan yang hanya diberikan perawatan luka dengan kassa lembab-kering.

Terdapat perbedaan jumlah kolagen pada kelompok perlakuan 1 (P1) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (P2) dan berdasarkan uji *post hoc* didapatkan bahwa perbedaan tersebut bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa kelompok yang mendapatkan kombinasi fenitoin dan vitamin C mengalami peningkatan jumlah kolagen yang lebih besar dibandingkan kelompok yang hanya mendapat fenitoin saja.

Sedangkan perbandingan jumlah kolagen kelompok P1 dengan kelompok P3, didapatkan perbedaan dengan nilai signifikansi yang bermakna ($p < 0,05$). Hasil perbandingan tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi fenitoin dan vitamin C meningkatkan jumlah kolagen yang lebih besar secara bermakna dibandingkan pemberian vitamin C saja.

Pengujian dilanjutkan dengan membandingkan kelompok perlakuan P2 dibandingkan dengan kelompok perlakuan P3. Didapatkan rata-rata jumlah kolagen pada kelompok P3 lebih besar dibandingkan rata-rata jumlah kolagen pada kelompok P2. Namun dari hasil uji *post hoc* didapatkan perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$), menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan peningkatan jumlah kolagen pada kelompok yang hanya diberikan fenitoin saja dibandingkan kelompok yang mendapat vitamin C saja.

Analisis Deskriptif Diameter Makroskopis Luka

Diameter makroskopis fistula enterokutan diukur setelah terminasi dilakukan. Diameter fistula enterokutan

diukur menggunakan program komputer ImageJ, kemudian data dari seluruh sampel dicatat dalam ukuran milimeter. Data rata-rata diameter fistula enterokutan pada tiap kelompok dapat diamati pada Tabel 2.

Dari tabel 2, kita dapat mengamati rata-rata diameter akhir terkecil adalah pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan terapi kombinasi fenitoin dan vitamin C yaitu sebesar $5,742 \pm 0,394$. Sedangkan rata-rata diameter akhir terbesar terdapat pada kelompok kontrol yang mendapatkan perawatan luka dengan kassa lembab-kering yaitu sebesar $9,395 \pm 0,582$. Dari hasil uji normalitas *Shapiro Wilk* didapatkan data berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan dari uji homogenitas data diperoleh nilai $> 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang diperoleh adalah homogen.

Uji Statistik Diameter Akhir

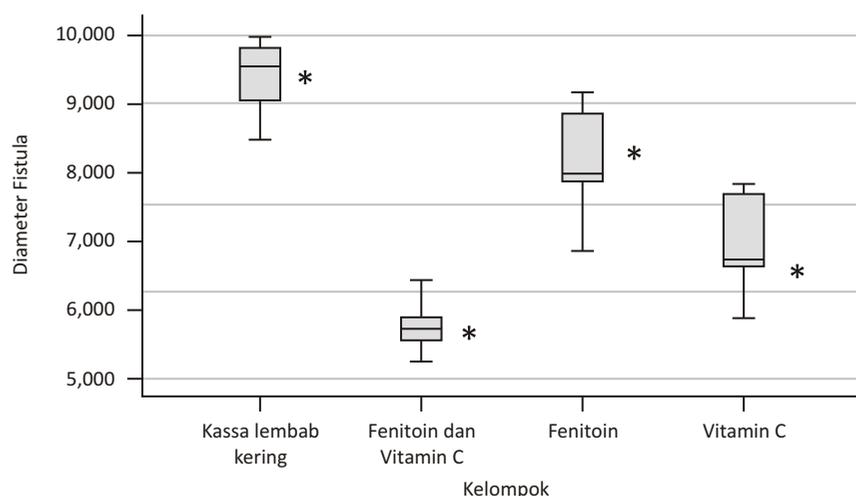
Pemeriksaan diameter akhir fistula di hari ke-7 memberikan hasil yang berbeda untuk pada tiap kelompok. Diameter fistula terkecil didapatkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang mendapatkan terapi kombinasi fenitoin dan vitamin C dengan nilai median sebesar 5,742 mm (5,201 – 6,388). Sedangkan median diameter fistula terbesar didapatkan pada kelompok kontrol yang hanya mendapatkan perawatan luka dengan kassa lembab-kering yaitu sebesar 9,541 mm (8,445 – 9,976). Pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang mendapat fenitoin oral didapatkan median diameter adalah 7,966 mm (6,839 – 9,150), sedangkan untuk kelompok perlakuan 3 (P3) yang mendapat terapi vitamin C adalah sebesar 5,709 mm (5,824 – 7,809).

Analisis statistik yang dilakukan dengan uji *One Way Anova* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,0001 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata

TABEL 2
Analisis deskriptif diameter fistula

Kelompok	Mean ± SD	Median (Min–Max)	P (Shapiro–Wilk)	Homogeneity test*
K (Kassa lembab – kering)	9,395 ± 0,582	9,541 (8,445–9,976)	0,456*	
P1 (Fenitoin + Vitamin C)	5,742 ± 0,394	5,742 (5,201–6,388)	0,804*	0,410**
P2 (Fenitoin)	8,101 ± 0,822	7,966 (6,839–9,150)	0,708*	
P3 (Vitamin C)	6,883 ± 0,744	5,709 (5,824–7,809)	0,535*	

Keterangan : *Normal ($p > 0,05$) **Homogen ($p > 0,05$)



Gambar 3. Grafik boxplot dari diameter akhir fistula enterokutan dari tiap kelompok. K: perawatan luka fistula dengan kassa lembab , P1: perawatan luka fistula dengan kombinasi fenitoin oral dan vitamin C oral, P2: perawatan luka fistula dengan fenitoin oral (P2), P3: perawatan luka fistula dengan vitamin C oral (P3). Terdapat perbedaan bermakna secara statistik (*One Way ANOVA* $P < 0,05$). Serta didapatkan pula perbedaan bermakna pada tiap kelompok perlakuan jika dibandingkan kelompok kontrol; * signifikan $P < 0,05$

diameter akhir fistula enterokutan berbeda secara signifikan. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk menguji beda antar kelompok.

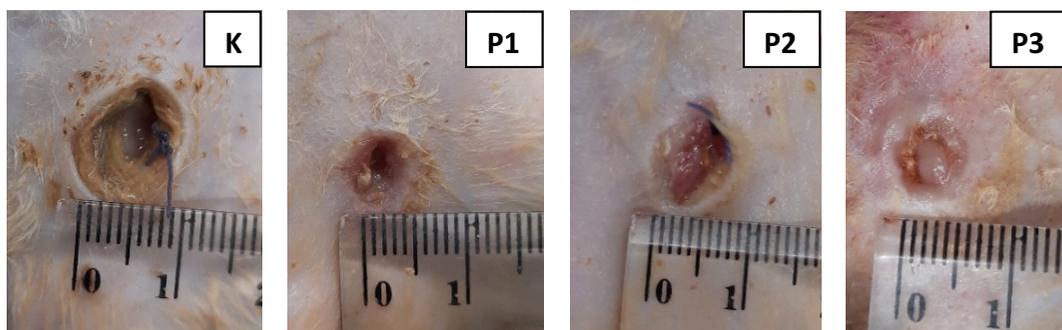
Dari hasil uji *Post Hoc* didapatkan, perbandingan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Hasil uji tersebut menunjukkan penurunan diameter yang lebih besar pada pemberian terapi fenitoin dan vitamin C baik diberikan secara sendiri-sendiri maupun kombinasi dibandingkan dengan yang hanya diberikan perawatan luka dengan kassa lembab–kering.

Terdapat perbedaan diameter akhir pada kelompok perlakuan P1 dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2 dan berdasarkan uji *post hoc* didapatkan

bahwa perbedaan tersebut bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa kelompok yang mendapatkan kombinasi fenitoin dan vitamin C mengalami penurunan diameter yang lebih besar dibandingkan kelompok yang hanya mendapat fenitoin saja.

Sedangkan perbandingan kelompok perlakuan P1 dengan kelompok perlakuan P3, didapatkan perbedaan dengan nilai signifikansi yang bermakna ($p < 0,05$). Hasil perbandingan tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi fenitoin dan vitamin C menurunkan diameter fistula yang lebih besar secara bermakna dibandingkan pemberian vitamin C saja.

Pengujian dilanjutkan dengan membandingkan kelompok perlakuan P2 dibandingkan dengan kelompok



Gambar 4. Penampakan makroskopis fistula enterokutan setelah pemberian terapi. (K: Kelompok kontrol, P1: Kelompok yang diberikan fenitoin dan vitamin C, P2: Kelompok yang diberikan fenitoin saja, P3: Kelompok yang diberikan vitamin C saja)

perlakuan P3. Dari hasil uji *post hoc* didapatkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa dimana terapi vitamin C lebih memperkecil diameter fistula daripada terapi fenitoin.

DISKUSI

Pada hari ke-7 perlakuan dilakukan terminasi hewan coba sekaligus pengambilan data. Pada masa ini luka berada dalam fase proliferasi proses penyembuhan luka, sehingga efek peningkatan jumlah kolagen dan efek terhadap penurunan ukuran fistula dapat diamati dengan jelas.²⁶ Beberapa indikator yang dapat diamati dari proses penyembuhan fistula adalah jumlah kolagen, jumlah fibroblast, angiogenesis, jumlah limfosit, dan penurunan diameter fistula. Peneliti mengamati jumlah kolagen secara mikroskopis serta diameter fistula sebagai variabel yang secara nyata menggambarkan proses penyembuhan fistula.

Jumlah kolagen fistula enterokutan

Kolagen merupakan salah satu indikator dalam proses penyembuhan luka. Kolagen berperan pada semua fase penyembuhan luka. Pada fase hemostasis dan inflamasi, fibrillar kolagen berperan penting dalam tahap awal penyembuhan luka karena dipercaya sebagai elemen kunci yang terlibat dalam peningkatan agregasi platelet setelah cedera vaskular.²⁵ Pada fase proliferasi, kolagen berperan pada proses kontraksi luka yang dimulai segera setelah terjadi luka dan mencapai puncak pada 2 minggu setelah luka.²⁶ Pada fase Maturasi dan remodelling, terjadi perubahan komposisi kolagen dimana kolagen tipe I yang lebih dominan pada fase awal terjadinya luka akan digantikan dengan kolagen tipe III hingga mendekati komposisi kolagen pada kulit sehat. Setelah beberapa bulan perubahan dalam komposisi kolagen dalam jaringan yang mengalami penyembuhan secara perlahan akan meningkatkan kekuatan jaringan hingga maksimum sekitar 80% dari jaringan normal.²⁷

Dari penelitian ini, dapat diamati peningkatan jumlah kolagen yang signifikan pada seluruh kelompok

perlakuan P1, P2 dan P3 (kombinasi fenitoin dengan vitamin C, fenitoin saja dan vitamin C saja) dibandingkan dengan kelompok kontrol K yang hanya mendapat perawatan luka dengan kassa lembab-kering. Perbedaan ini menunjukkan manfaat pemberian fenitoin dan vitamin C terhadap peningkatan jumlah kolagen, baik diberikan secara kombinasi maupun secara sendiri-sendiri. Temuan ini sejalan dengan penelitian terdahulu mengenai manfaat fenitoin dan vitamin C terhadap peningkatan kolagen. Meena *et al* pada penelitiannya mengenai efek fenitoin pada luka bakar tikus putih juga menemukan bahwa terjadi peningkatan jumlah kolagen pada kelompok tikus yang diaplikasikan fenitoin dibandingkan dengan kelompok kontrol yang mendapat perawatan dengan normal saline.²⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Kato *et al*, didapatkan peningkatan jumlah kolagen pada hipertrofi ginggiva pada manusia yang mendapatkan terapi fenitoin.²⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Mohammed *et al* pada luka *full thickness* tikus, menunjukkan bahwa terdapat peningkatan jumlah kolagen pada tikus yang mendapat vitamin C dibandingkan dengan kelompok yang mengalami defisiensi vitamin C.²¹

Hasil uji *Post hoc* antar kelompok perlakuan menunjukkan bahwa, kelompok perlakuan P2 yang mendapat terapi kombinasi fenitoin dengan vitamin C, mengalami peningkatan jumlah kolagen yang signifikan dibandingkan kelompok perlakuan P2 dan P3, yang mendapat terapi fenitoin saja maupun vitamin C saja. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi fenitoin dan vitamin C mampu memberikan efek akumulasi jumlah kolagen secara sinergis, sehingga terjadi peningkatan kolagen yang bermakna pada kelompok kombinasi fenitoin dan vitamin C dibandingkan pemberian secara sendiri-sendiri. Sebagian besar penelitian tentang pengaruh vitamin C terhadap aktifitas pembentukan jaringan ikat telah dilakukan dan telah menunjukkan manfaat vitamin C dalam sintesis, maturasi dan sekresi kolagen.³⁰ Vitamin C bertindak sebagai kofaktor pada proses sintesis kolagen. Pembentukan kolagen membutuhkan vitamin C

untuk hidroksilasi prolin, suatu proses yang memungkinkan molekul kolagen mencapai konfigurasi terbaik dan mencegah kolagen menjadi lemah dan rentan terhadap kerusakan. Vitamin C juga meningkatkan mRNA prokolagen dan diperlukan untuk mengeksport molekul prokolagen keluar dari sel.³¹ Sedangkan peran fenitoin telah diketahui mampu meningkatkan jumlah kolagen pada luka melalui mekanisme penurunan degradasi kolagen. Pada jalur degradasi kolagen ekstraseluler, *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan kolagenase bertanggung jawab untuk degradasi kolagen. Aktivitas enzimatik MMP dikendalikan oleh *Tissue inhibitor matrix metalloproteinases* (TIMP) yang fungsinya untuk menghambat aksi MMPs.³² Pada 2005, Kato *et al* menunjukkan bahwa ekspresi gen MMP-1, 2, dan 3 menurun jumlahnya dengan pemberian fenitoin, sedangkan TIMP meningkat. Kato *et al* juga menyebutkan bahwa terjadi penurunan pembentukan MMPs oleh makrofag dengan pemberian fenitoin.²⁹

Penelitian ini menunjukkan rata-rata jumlah kolagen pada kelompok perlakuan P3 yang mendapat terapi vitamin C, lebih meningkat dibandingkan rata-rata pada kelompok perlakuan P3 yang mendapat terapi fenitoin. Pengujian secara statistik tidak mendapatkan perbedaan yang bermakna dari kedua kelompok tersebut. Hal tersebut menunjukkan bahwa fenitoin dan vitamin C memiliki manfaat terhadap peningkatan jumlah kolagen pada fistula enterokutan tikus wistar.

Peneliti menggunakan uji *Intraclass Correlation Coefficient* (ICC) untuk mengetahui kesepakatan (*agreement*) kolagenasi pada sampel yang diamati oleh dua ahli patologi anatomi. Kami mendapatkan kesepakatan (*agreement*) yang sangat baik antara keduanya (ICC 0.98 dengan *Confidential Interval* 95% : 0,97–99).

Ukuran Makroskopis Fistula Enterokutan

Salah satu indikator dalam proses penyembuhan luka adalah penurunan diameter luka.³³ Proses penurunan diameter luka terjadi karena adanya kontraksi luka yang merupakan suatu proses dimana tepi luka dari semua sisi tertarik secara sentripetal pada luka yang terbuka.²⁶ Kontraksi luka merupakan hasil dari kombinasi kekuatan traksi yang dihasilkan oleh migrasi fibroblast dan aksi fenotip fibroblast khusus, yaitu myofibroblast.^{34,35}

Dari penelitian ini tampak perbedaan diameter fistula yang signifikan pada seluruh kelompok yang mendapatkan perlakuan P1, P2 dan P3 (kombinasi fenitoin dengan vitamin C, fenitoin saja dan vitamin C saja) dibandingkan dengan kelompok kontrol K yang hanya mendapat perawatan luka dengan kassa lembab–kering. Perbedaan ini menunjukkan manfaat pemberian fenitoin dan vitamin C terhadap proses penyembuhan luka, baik diberikan secara kombinasi maupun secara sendiri-sendiri. Temuan mengenai

manfaat fenitoin ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Usha *et al* yang menyebutkan bahwa aplikasi fenitoin secara signifikan menurunkan area luka pada luka insisi tikus wistar dibandingkan dengan yang mendapat perawatan luka dengan kassa lembab–kering.³⁶ Manfaat fenitoin pada penyembuhan luka juga diamati oleh Meena *et al*, dimana kelompok tikus putih yang mendapat terapi fenitoin terbukti mengalami penurunan area luka bakar yang signifikan dibandingkan dengan kelompok yang diberikan silversulfadiazin dan kelompok yang mendapat terapi dengan normal saline.²⁸ Penelitian lain yang dilakukan oleh Hajong *et al* pada 100 orang pasien ulkus diabetes, menunjukkan bahwa pemberian fenitoin mempercepat waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya kontraksi luka 50% dari luka awal (13,42 hari) dibandingkan dengan pasien yang mendapatkan perawatan luka dengan normal saline (23,16 hari).¹⁴ Penelitian ini juga menunjukkan manfaat pemberian vitamin C oral yang secara signifikan menurunkan diameter fistula enterokutan tikus wistar dibandingkan dengan yang hanya dilakukan perawatan luka dengan kassa lembab–kering. Hasil temuan tersebut sejalan dengan hasil penelitian Jagetia *et al*, yang menyebutkan bahwa pemberian vitamin C mampu meningkatkan kontraksi luka pada mencit yang terekspos radiasi sinar γ .³³ Bikker *et al* melaporkan *case report* mengenai pasien yang mengalami *wound dehiscence* pasca operasi *laparotomy* eksplorasi atas indikasi divertikulitis. Terjadi penurunan luas luka hingga sepertiga dari luas awal pada minggu ke 2 pemberian vitamin C, dan terjadi penutupan luka secara spontan setelah 2,5 bulan pemberian vitamin C.³⁷

Hasil uji *Post Hoc* juga menunjukkan bahwa kelompok P1 yang mendapat terapi kombinasi fenitoin dengan vitamin C mengalami penurunan diameter yang lebih besar daripada kelompok perlakuan lain, baik pada kelompok P2 maupun P3 yang hanya mendapat fenitoin saja maupun vitamin C saja. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi fenitoin dan vitamin C mampu memberikan efek pengecilan diameter fistula enterokutan secara sinergis, sehingga diameter fistula akhir menjadi lebih kecil dibandingkan pemberian fenitoin dan vitamin C secara sendiri-sendiri. Pengecilan diameter luka adalah hasil dari terjadinya kontraksi luka, yang merupakan gabungan dari kekuatan traksi yang dihasilkan oleh migrasi fibroblast dan aksi myofibroblast.³⁴ Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa fenitoin memiliki aksi stimulasi pada fibroblast dan akumulasi kolagen yang merupakan komponen penting dalam kontraksi luka,¹⁹ sedangkan vitamin C bertindak sebagai kofaktor pada proses sintesis kolagen. Tanpa kadar vitamin C yang cukup, pembentukan kolagen akan terganggu.³¹ Myofibroblast dan kolagen berperan penting pada proses kontraksi luka, pseudopodia pada myofibroblast dapat meluas dan mengikat fibronectin ekstraseluler atau menempel pada

serat kolagen dan menarik serat kolagen dengan demikian menghasilkan kontraksi luka.²⁶ Penelitian yang dilakukan Russel *et al* memberikan hasil yang menarik dimana pada hipertrofi ginggiva yang terinduksi fentoin ditemukan peningkatan jumlah myofibroblast dan kolagen.³⁸ Kedua komponen tersebut merupakan komponen penting dalam proses kontraksi luka yang mengakibatkan pengecilan diameter luka.¹⁹

Diameter fistula kelompok P3 (vitamin C) menunjukkan pengecilan diameter fistula yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok P2 (fenitoin). Temuan ini menunjukkan manfaat vitamin C lebih unggul dalam memperkecil diameter fistula dibandingkan manfaat pemberian fenitoin. Kemampuan vitamin C dalam menurunkan diameter luka diperkirakan karena kemampuannya dalam meningkatkan akumulasi kolagen, meningkatkan jumlah fibroblast serta menekan produksi mediator pro inflamasi.^{30,33}

Penelitian mengenai manfaat pemberian fenitoin dan vitamin C masih dapat disempurnakan pada penelitian-penelitian di masa depan. Pada penelitian ini proses penyembuhan fistula hanya diamati hingga hari ketujuh perlakuan dimana fase penyembuhan luka masih berlangsung, di masa mendatang dapat dilakukan penelitian dengan masa pengamatan yang lebih panjang sehingga dapat mengamati fase penyembuhan luka hingga tuntas. Karena keterbatasan peneliti, pengamatan kolagen pada penelitian ini dengan metode histopatologi. Pada penelitian selanjutnya dapat ditingkatkan dengan menggunakan metode imunohistokimia. Sehingga pengamatan dapat lebih akurat dan dapat dilakukan pengamatan terhadap petanda proses penyembuhan luka lain seperti *growth factor*, makrofag, dan mediator-mediator lain.

SIMPULAN

Pemberian suplemantasi vitamin C, fenitoin oral secara sendiri ataupun kombinasi meningkatkan kolagen dan memperkecil diameter fistula enterokutan tikus wistar, dan pemberian kombinasi lebih baik dibanding tunggal.

DAFTAR PUSTAKA

- Dodiyi-Manuel A, Wichendu PN. Current concepts in the management of enterocutaneous fistula. *International Surgery Journal*. 2018;5(6):f81-5.
- Dumas R, Moore S, Sims C. Enterocutaneous Fistula: Evidence-based Management. *Clin Surg* 2017; 2. 2017;1435.
- Gribovska-Rupp I, Melton GB. Enterocutaneous fistula: proven strategies and updates. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2016;29(02):130-7.
- Okoli C, Oparocha D, Onyemkpa J. Enterocutaneous Fistula: Aetiology and management outcome in a tertiary center in Nigeria. *Afrimedical Journal*. 2013;4(1):17-21.
- Haack CI, Galloway JR, Srinivasan J. Enterocutaneous fistulas: a look at causes and management. *Current surgery reports*. 2014;2(10):71.
- Weledji E. Perspectives on enterocutaneous fistula: A review article. *Med Clin Rev*. 2017;3:5.
- Wercka J, Cagol PP, Melo ALP, Locks GdF, Franzone O, Kruel NF. Epidemiology and outcome of patients with postoperative abdominal fistula. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2016;43(2):117-23.
- Heimroth J, Chen E, Sutton E. Management Approaches for Enterocutaneous Fistulas. *The American Surgeon*. 2018;84(3):326-33.
- Wainstein DE, Fernandez E, Gonzalez D, Chara O, Berkowski D. Treatment of high-output enterocutaneous fistulas with a vacuum-compaction device. A ten-year experience. *World journal of surgery*. 2008;32(3):430-5.
- Lambert K, Hayes P, McCarthy M. Vacuum assisted closure: a review of development and current applications. *European journal of vascular and endovascular surgery*. 2005;29(3):219-26.
- Limengka Y, Jeo WS. Spontaneous closure of multiple enterocutaneous fistula due to abdominal tuberculosis using negative pressure wound therapy: a case report. *Journal of Surgical Case Reports*. 2018;2018(1):rjy001.
- Wang W, Pan Z, Hu X, Li Z, Zhao Y, Yu A. Vacuum-assisted closure increases ICAM-1, MIF, VEGF and collagen I expression in wound therapy. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;7(5):1221-6.
- Sengupta M, Banerjee P, Paul S, Sengupta J, Ghosh M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. *Muller J Med Sci Res*. 2015;6:27-30.
- Hajong R, Naku N, Hajong D, Anand M, Lenish K, Singh NM. Effect of topical phenytoin on wound healing. *Group*. 2016;1(50):17.36.
- Hagh LG, Karimi B, Moghimipour E, Abdi Z, Abdolalian F, Rohani A. Histological Evaluation of Wound Healing Effect of Topical Phenytoin on Rat Hard Palate Mucosa. *Journal of Research in Medical and Dental Science*. 2018;6(2):466-72.
- Jaber SA, Fallatah BM, Tayara B, Yami H, Abdelmoeti M. Intravenous phenytoin: potential new therapy for gastrointestinal fistulae. *J Surg*. 2013;1(3):11-4.
- Shakeri F, Tebyanian H, Karami A, Babavalian H, Tahmasbi MH. Effect of topical phenytoin on wound healing. *Trauma Monthly*. 2017;22(5).
- Jaber S, Rihy Z, Joseph R, Al-Khayat M. Does phenytoin improve the healing of gastrointestinal fistulas? Case reports in gastroenterology. 2011;5(1):52-5.
- Firmino F, Almeida AMPd, Alves GdS, Grandeiro DdS, Penna LHG. Scientific production on the applicability of phenytoin in wound healing. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2014;48(1):162-9.
- Turan M, Saraydin SU, Canbay E, Karadayi K, Bulut E, Cetinkaya Ö, *et al*. Positive effects of phenytoin on experimental colonic anastomoses. *International journal of colorectal disease*. 2004;19(3):250-7.
- Mohammed BM, Fisher BJ, Kraskauskas D, Ward S, Wayne JS, Brophy DF, *et al*. Vitamin C promotes wound healing through novel pleiotropic mechanisms. *International wound journal*. 2016;13(4):572-84.
- Dudrick SJ, Maharaj AR, McKelvey AA. Artificial nutritional support in patients with gastrointestinal fistulas. *World journal of surgery*. 1999;23(6):570-6.
- Valsangkar N, Schmidt H, Nancy Strange R, Wooden W, Ceppa EP. Is scurvy a 21st century diagnosis? Implications on surgical patients. 2019.
- Bültmann O, Philipp C, Ladeburg M, Berlien H-P. Creation of a caecostoma in mice as a model of an enterocutaneous fistula. *Research in experimental medicine*. 1998;198(4):215-28.
- McPherson JM, Piez KA. Collagen in dermal wound repair.

- The molecular and cellular biology of wound repair: Springer; 1988. p. 471-96.
26. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):9-18.
 27. Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, Diegelmann RF. Principles of Wound Healing. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Internet]: University of Adelaide Press; 2011.
 28. Meena K, Mohan A, Sharath B, Somayaji S, Bairy K. Effect of topical phenytoin on burn wound healing in rats. 2011.
 29. Kato T, Okahashi N, Ohno T, Inaba H, Kawai S, Amano A. Effect of phenytoin on collagen accumulation by human gingival fibroblasts exposed to TNF- α in vitro. *Oral diseases*. 2006;12(2):156-62.
 30. Ronchetti IP, Quaglino D, Bergamini G. Ascorbic acid and connective tissue. *Subcellular biochemistry*: Springer; 1996. p. 249-64.
 31. Sharma S, Poddar R, Sen P, Andrews J. Effect of vitamin C on collagen biosynthesis and degree of birefringence in polarization sensitive optical coherence tomography (PS-OCT). *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(12).
 32. Corrêa JD, Queiroz-Junior CM, Costa JE, Teixeira AL, Silva TA. Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features. *ISRN dentistry*. 2011;2011.
 33. Jagetia G, Rajanikant G, Baliga M, Rao K, Kumar P. Augmentation of wound healing by ascorbic acid treatment in mice exposed to γ -radiation. *International journal of radiation biology*. 2004;80(5):347-54.
 34. Theoret C. Physiology of wound healing. *Equine wound management*. 2016:1-13.
 35. Teller P, White TK. The physiology of wound healing: injury through maturation. *Perioperative Nursing Clinics*. 2011;6(2):159-70.
 36. Usha N, Sirisha G. IJBCP International Journal of Basic and Clinical Pharmacology. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*. 2016;5(6):2684.
 37. Bikker A, Wielders J, Van Loo R, Loubert M. Ascorbic acid deficiency impairs wound healing in surgical patients: Four case reports. *International Journal of Surgery Open*. 2016;2:15-8.
 38. Dill RE, Iacopino AM. Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *Journal of periodontology*. 1997;68(4):375-80.