

GROWTH OF COLLAGEN AND FIBROBLAST NETWORK IN DOGS WITH DERMATITIS POST ECOENZYME TREATMENT

(Pertumbuhan jaringan kolagen dan fibroblast anjing penderita dermatitis pasca terapi ecoenzym)

Kadek Ferdy Agastia Dwi Pratama^{1*}, I Nyoman Suartha², I Ketut Berata³, Luh Made Sudimartini⁴

¹Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;

²Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;

³Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;

⁴Laboratorium Farmakologi dan Farmasi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;

*Corresponding author email: Fagastia@gmail.com

How to cite: Pratama KFAD, Suartha IN, Berata IK, Sudimartini LM. 2024. Growth of collagen and fibroblast network in dogs with dermatitis post coenzyme treatment. *Bul. Vet. Udayana*. 16(1): 1-8. DOI:

<https://doi.org/10.24843/bvu.v16i1.32>

Abstract

Alternative products have recently been growing rapidly in society, the existence of these products is also a way to support efforts to preserve the environment. Alternative products are often used as an alternative to disease therapy, as is the case with fermented products called coenzymes. The active ingredients contained in coenzymes have benefits as anti-inflammatory, anti-arthritis, antipyretic, hypoglycemic, anti-gastric ulcer, spermicidal, anti-fungal, antibacterial, diuretic, antimalarial, antitumor, and immunomodulator. This study aims to determine the role of coenzymes in the development process of collagen and fibroblast tissue in dogs suffering from Atopic Dermatitis skin disease. In this study, 5 swimming female dogs were tested aged 4 months to 6 months, which were divided into 2 groups with 2 different concentrations. The first group with 3 dogs treated with coenzyme baths with a concentration of 10% were bathed twelve times every three days. The second group with 2 dogs treated with coenzyme bathing was bathed with 10% coenzyme three times every three days, then a week after that the coenzyme level was reduced to 2% and bathed four times once a week. The administration of this coenzyme was in the form of a bath with water mixed with coenzyme, then observations were made microscopically on collagen and fibroblast tissue. In this study it was concluded that coenzyme could be an effective alternative treatment for treating atopic dermatitis characterized by the density of collagen and fibroblast tissue for 5 weeks of coenzyme administration by bathing.

Keywords: Alternative, collagen, dermatitis, coenzyme, fibroblasts, microscopic.

Abstrak

Produk alternatif belakangan ini semakin berkembang pesat penggunaannya di masyarakat, keberadaan produk ini juga merupakan cara untuk mendukung upaya pelestarian lingkungan. Produk alternatif sering digunakan sebagai alternatif terapi penyakit, seperti halnya pada produk hasil fermentasi

bernama ecoenzym. Bahan aktif yang terkandung di dalam ecoenzym memiliki manfaat sebagai, antiinflamasi, antiarthritik, antipiretik, hipoglikemik, antigastrik ulcer, spermicidal, anti-fungal, antibakteri, diuretic, antimalaria, antitumor, dan immunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan ecoenzym dalam proses perkembangan jaringan kolagen dan fibroblast pada anjing yang menderita penyakit kulit *Dermatitis Atopic*. Pada penelitian ini diujikan pada 5 ekor anjing betina dengan renang usia 4 bulan hingga 6 bulan, yang dimana dibagi menjadi 2 kelompok dengan 2 jenis konsentrasi yang berbeda. Kelompok pertama dengan 3 ekor anjing perlakuan pemandian ecoenzym dengan konsentrasi 10% dimandikan sebanyak dua belas kali setiap tiga hari sekali. Kelompok kedua dengan 2 ekor anjing perlakuan pemandian ecoenzym dimandikan ecoenzyme 10% tiga kali setiap tiga hari sekali, kemudian seminggu setelahnya kadar eoenzym diturunkan menjadi 2% dan dimandikan empat kali seminggu sekali. Pemberian ecoenzym ini berupa pemandian dengan air yang dicampurkan ecoenzym, lalu pengamatan dilakukan secara mikroskopis pada jaringan kolagen dan fibroblast. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa ecoenzym dapat menjadi alternatif pengobatan yang efektif untuk mengobati dermatitis atopik dengan ditandai oleh kepadatan jaringan kolagen serta fibroblast selama 5 minggu pemberian ecoenzym dengan cara dimandikan.

Kata kunci: Alternatif, dermatitis, ecoenzym, fibroblast, kolagen, mikroskopis.

PENDAHULUAN

Hewan anjing merupakan salah satu makhluk yang keberadaannya sangat dekat dengan manusia. Keberadaan anjing dimasyarakat kerap dimanfaatkan sebagai hewan peliharaan yang dapat memberikan motivasi kepada pemilik untuk diajak berolahraga dan dapat menurunkan tingkat stres (Sudipa *et al.*, 2012) Namun, seiring dengan perkembangan zaman, banyak ditemukan masalah pada anjing, terutama masalah kesehatan kulit. Kulit merupakan organ terbesar yang membentang di seluruh dari tubuh anjing, fungsi kulit digunakan sebagai sebuah pelindung terhadap lingkungan, mengatur suhu, dan membuat anjing dapat merasakan sentuhan. Secara lapisan, kulit memiliki tiga lapisan utama yakni, epidermis atau lapisan terluar, dermis atau lapisan tengah, dan subkutan atau lapisan terdalam (Moriello, 2018).

Canine Dermatitis dapat didefinisikan sebagai penyakit kulit yang terjadi akibat alergi inflamasi dan pruritus. Dengan kecenderungan gambaran klinis yang khas, dermatitis sering dikaitkan terhadap alergen lingkungan, dengan faktor penyebabnya antara lain seperti: faktor genetik (fenotipe terkait breed), luasnya lesi (terlokalisasi atau umum), stadium penyakit (akut atau kronis), dan adanya infeksi mikroba sekunder atau faktor lainnya (Hensel *et al.*, 2015). Sebagai penyakit inflamasi pruritus, persebaran lesi dapat terjadi pada area lipatan kulit yang lebih tipis dan tanpa rambut, contohnya daerah antibrachial, aksila, dan daerah inguinal, Moncong, daerah periokular, pinnae, dan area interdigital yang merupakan area dimana paparan alergen sering terjadi (Marsella, 2021).

Pengobatan terhadap dermatitis selama ini sering bertitik tumpu pada obat kimia seperti penisilin, tetrasiklin, doxyciklin, minocyclin, ampisilin, amoksisilin, serta obat golongan ivermectin. Secara tidak langsung, penggunaan obat kimia secara terus menerus dalam waktu lama justru akan memberikan efek samping yang beresiko merugikan (Deboer, 2005). Saat ini, terdapat jenis pengobatan alternatif berbahan dasar alami yang sering disebut dengan obat herbal. Salah satu obat herbal tersebut yaitu pemanfaatan produk ecoenzym. Ecoenzym merupakan produk dari hasil fermentasi limbah dapur organik yang terdiri dari ampas buah, sayuran, gula, dan air (Prasetio *et al.*, 2021). Komposisi seperti tanaman mimba, pegagan, dan sirsak menjadikan produk ecoenzym memiliki sifat sebagai anti parasit, anti bakteri, anti inflamasi, antivirus, anti jamur. Penggunaan produk ini diduga efektif digunakan sebagai obat herbal dalam mengatasi permasalahan kulit terutama dermatitis. Dari segi pencarian bahan pembuatan ecoenzym tergolong bahan sederhana yang mudah untuk didapatkan, mengingat Indonesia kaya akan bahan herbal yang banyak tumbuh subur di alam. Dari segi ekonomi,

penggunaan bahan ini secara tidak langsung menguntungkan para petani dalam melakukan budidaya tanaman ini. Keuntungan lain yang dapat diperoleh adalah pelestarian lingkungan dan perlindungan tanaman langka (Suartha *et al.*, 2015) Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan jaringan kolagen dan fibroblast pada anjing penderita dermatitis pasca pemberian ecoenzym.

METODE PENELITIAN

Objek Penelitian

Objek penelitian ini menggunakan 5 ekor anjing betina yang mengalami dermatitis atopik. Dimana seluruh anjing akan dihitung sebagai kontrol di hari pertama sebelum perlakuan diberikan. Anjing yang digunakan merupakan anjing ras lokal dengan kisaran umur 4 bulan hingga 6 bulan. Hewan anjing didapatkan dari beberapa pemilik di wilayah kabupaten Gianyar, dan Badung dengan pola perawatan dikandangan.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian jenis deskriptif dengan mempergunakan 5 ekor anjing, dengan mula-mula anjing dilakukan pengadaptasian pada tempat karantina selama 1 minggu. Lanjut pada prosedur biopsi, dilakukan anestesi total menggunakan xylazine dan ketamin. Selanjutnya biopsi dilakukan dengan menggunakan pisau bedah dan gunting bedah dengan pengambilan sediaan kulit yang diambil dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm² kemudian jaringan biopsi difiksasi dengan phosphate buffer formalin 10% selama 48 jam. Biopsi akan dilakukan pengulangan selama dua minggu sekali, dengan perlakuan terapi menggunakan ecoenzym dengan metode pemandian tiga hari sekali dan empat hari sekali dan sebelum di biopsi rambut anjing dicukur terlebih dahulu. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan analisis secara deskriptif kualitatif.

Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini ada tiga adalah variabel bebas yakni Ecoenzym daun mimba, variabel terikat yaitu pertumbuhan jaringan kolagen dan fibroblast pada anjing yang menderita dermatitis, dan Variabel kendali adalah anjing dermatitis tingkat sedang, umur, pakan, dan disinfeksi lingkungan.

Prosedur Penelitian

Kelaikan etik hewan coba

Seluruh prosedur penggunaan hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini diajukan persetujuan dari Komite Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, untuk dapat memperoleh Sertifikat Persetujuan Etik Hewan dengan nomor: B/207/UN14.2.9/PT.01.04/2022

Pemeliharaan anjing

Anjing yang digunakan sebagai sampel penelitian dilakukan adaptasi terlebih dahulu ditempat karantina selama satu minggu sebelum diberikannya perlakuan.

Pemberian ecoenzym

Pemberian Ecoenzym dilakukan saat proses pemandian dimana anjing dibagi menjadi 2 kelompok dengan 2 jenis konsentrasi yang berbeda. Kelompok pertama dengan 3 ekor anjing dengan perlakuan pemandian ecoenzym dengan konsentrasi 10% dimandikan sebanyak dua belas kali setiap tiga hari sekali. Kelompok kedua yakni dengan 2 ekor anjing dengan perlakuan pemandian ecoenzym dimandikan eco enzyme 10% tiga kali setiap tiga hari sekali, kemudian

seminggu setelahnya kadar eoenzym diturunkan menjadi 2% dan dimandikan empat kali seminggu sekali. Kedua kelompok ini sama-sama diberikan perlakuan dengan rentang waktu 5 minggu.

Pengambilan sampel penelitian

Pengambilan sampel kulit dilakukan di Balai Besar Veteriner Denpasar. Sebelum dilakukan pengambilan sampel, anjing terlebih dahulu dilakukan anestesi total pada bagian intramuskular dengan injeksi xylazine dan ketamin dengan rumus pemberian pemberian xylazine 0,15/Kg BB. Ketamin 10mg/Kg BB. Setelah xylazine dan ketamin terabsorpsi selama lima hingga sepuluh menit, maka biopsi dapat dilakukan menggunakan pisau bedah dan gunting bedah dengan melakukan pengambilan kulit pada daerah yang terdapat dermatitis dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm² yang kemudian kemudian jaringan biopsi difiksasi dengan phosphate buffer formalin 10% selama 48 jam.

Pembuatan preparat

Setelah didapatkannya sampel biopsi kulit maka akan masuk pada proses trimming atau proses pengecilan organ dengan perlakuan pengirisan tipis pada organ. Irisan organ ini lalu disimpan dalam tissue processor. Berikutnya, pada organ dilakukan proses dehidrasi dan clearing dengan beberapa larutan yang dilakukan persesi, larutan ini diantaranya alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol absolute I, absolut II, xilol I, xilol II, parafin, dan terakhir ke dalam parafin II. Masing-masing perendaman dilakukan dua jam. Setelah melewati keseluruhan rangkaian itu maka akan memasuki perlakuan embedding atau penanaman jaringan dalam parafin cair yang nantinya akan dibekukan dalam refrigerator untuk memudahkan pemotongan dengan 11 mikrotom. Ketebalan pemotongan jaringan dilakukan dengan ukuran mikrotom 5-6 µm dengan hasil potongan berbentuk pita yang diletakkan di atas air hangat untuk menghindari lipatan akibat pemotongan. Setelah melawati keseluruhan perlakuan selanjutnya sediaan diletakkan pada gelas objek dan dikeringkan dalam inkubator bersuhu 60°C selama 24 jam.

Pewarnaan hematoksin eosin

Sediaan preparat pada gelas objek direndam dalam xylol 1 dan xylon 2 masing-masing selama dua menit untuk dilakukan deparafinasi. Selanjutnya masuk ke tahap rehidrasi dengan perlakuan perendaman secara berurut dalam alkohol absolut, alkohol 95%, dan alkohol 80% masing-masing dengan waktu dua menit setelah itu lalu dicuci di air yang mengalir. Selanjutnya pewarnaan dengan Hematoksin dilakukan dengan waktu 8 menit, yang jika sudah lanjut dengan pembilasan dari air mengalir, selanjutnya dicuci dengan Lithium karbonat selama 15-30 detik, setelah selesai dibilas kembali dengan air mengalir, lalu diwarnai dengan eosin selama 2-3 menit. Sediaan yang telah diwarnai dengan eosin kemudian dicuci dengan air mengalir dan siap untuk dikeringkan. Selanjutnya sediaan dimasukkan ke dalam alkohol 95% dan alkohol absolut masing-masing sebanyak 10 kali celupan, lalu ke dalam alkohol absolut 2 selama 2 menit. Selanjutnya ke dalam xylol 1 selama 1 menit dan xylol 2 selama 2 menit. Sediaan kemudian ditetaskan dengan perekat permonium dan ditutup dengan gelas penutup dan selanjutnya dapat diperiksa di bawah mikroskop.

Hasil pemeriksaan tampilan kolagen dan fibroblast

Interpretasi hasil tampilan kolagen dan fibroblast didapatkan dengan melakukan cropping (pembatasan area) kolagen yang tampak pada lima lapang pandang dari setiap preparat. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop OLYMPUS seri BX 41 yang telah dilengkapi dengan kamera digital serta memakai software OLYSIA. Tampilan kolagen dinyatakan sebagai pixel². Hasil pengamatan pada masing-masing preparat di lima lapang pandang kemudian dihitung dan dirata-rata.

Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis dengan uji pengamatan deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Dari pemeriksaan histopatologi jaringan kulit anjing penelitian didapatkan hasil yang bervariasi. Hasil pertumbuhan kolagen dan fibrosit pada kelompok anjing 1 serta kelompok 2 yang menderita dermatitis yang diberi ecoenzym tersaji pada tabel 1. Dari tabel 1 tampak adanya pertumbuhan kolagen meningkat mulai pada minggu ke-1 pada anjing kelompok 2 yakni anjing Momo dan Lucy. Sedangkan pada anjing kelompok 1 yakni anjing Lonto, Ciko dan Loni, pertumbuhan kolagen terjadi pada minggu ke-2. Untuk jelasnya dapat dilihat grafik pertumbuhan kolagen dan fibrosit pada gambar 1.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan kepadatan kolagen serta sel fibroblast pada anjing yang menderita dermatitis. Peningkatan jumlah berkas kolagen serta fibrosit selama pemberian perlakuan pada percobaan ini terlihat dari perubahan yang ditunjukkan dari analisis deskriptif pada kolom grafik yang menunjukkan adanya perbedaan darisebelum dan sesudah dilakukan perlakuan pada kelima ekor anjing. Dimulai minggu ke-0 menuju minggu ke-1 rata-rata anjing mengalami penurunan jumlah kolagen dan fibrosit, dimana ini terjadi akibat adanya respon adaptasi tubuh terhadap bahan aktif pada ecoenzym, lalu pada minggu ke-2 hingga ke-4 pertumbuhan serabut kolagen dan sel fibrosit mulai tumbuh dengan sangat lambat.

Pembahasan

Pertumbuhan kolagen serta sel fibrosit yang terjadi dari waktu ke waktu selama pemberian perlakuan terhadap lima ekor anjing diduga disebabkan oleh larutan ecoenzym yang di dalamnya terkandung senyawa flavonoid (Vama dan Cherekar, 2020). Kandungan flavonoid dapat membantu mempercepat pertumbuhan kolagen (mensintesis kolagen) melalui peningkatan fibroblast dan pembentukan jaringan (Kastika dan Rahayu, 2018).

Kolagen merupakan komponen protein utama yang menyusun komponen matrik ekstraseluler dan merupakan protein yang paling banyak ditemukan di dalam tubuh. Secara pembentukan, kolagen terbentuk secara berurutan meliputi kombinasi dari asam amino ke bentuk rantai, lalu bergabung membentuk molekul, dan kemudian bergabung untuk membentuk fibril-fibril yang menyatu ke dalam bundle. Dalam melakukan sintesis kolagen diperlukan sel utama berupa fibroblast yang merupakan tipe sel utama untuk sintesis kolagen. Dalam permasalahan kulit seperti peradangan kulit *dermatitis*, kolagen memiliki peran dalam proses kesembuhan luka pasca kulit terjadi peradangan (Triyono, 2005).

Fibroblast merupakan sel yang menghasilkan komponen ekstrasel dari jaringan ikat yang bisa berkembang. Bila fibroblast menjadi relatif tidak aktif dalam membuat serat, ahli histologi menyebutnya sebagai fibrosit (Wirata, 2019). Pada umumnya pertumbuhan fibroblast didalam tubuh dapat terjadi karena adanya reaksi senyawa kimia didalam tubuh berupa senyawasitokin TGF β (Transforming growth factor- β , dan FGF (*Fibroblast growth factor*) yang diproduksi oleh kelenjar hipofisis sebagai faktor pertumbuhan. Secara mekanisme TGF β berperan dalam menstimulasi daya kemotaksis fibroblast, lalu dilanjutkan dengan inhibisi produksi kolagen dan fibronektin (Triyono, 2005). Selanjutnya sintesis kolagen oleh fibroblast, dalam bentuk prokolagen yang berada pada ekstraseluler sebelumnya diperlukan proses intraseluler, mula-mula pada nukleus terjadi pengaktifan gen yang merubah mRNA menjadi rantai polipeptida, lalu mRNA masuk ke dalam sitoplasma dan diubah menjadi ribosom. Dari retikulum endoplasma dan secara simultan terjadi sintesis rantai polipeptida triple. Tiga rantai yang

identik sebagai kolagen tipe III dan tiga rantai yang berbeda sebagai tipe I. selanjutnya Prokolagen meninggalkan sel kemudian beberapa asam amino membelah dan membentuk tropokolagen atau molekul kolagen. Molekul ini lalu bersatu ke dalam fibril-fibril dan mengalami cross-linking menjadi lebih tebal atau bundle. Secara penelitian peningkatan fibrosit di dalam tubuh belum diketahui pasti faktor penyebabnya, namun beberapa dugaan faktor seperti faktor pertumbuhan, nutrisi, tekanan parsial oksigen, dan konsentrasi laktat dapat menjadi penyebabnya laju pertumbuhan fibroblast di dalam tubuh (Triyono, 2005). Ditambah dengan adanya respon stres pada tubuh yang menyebabkan lonjakan peningkatan sistem imun berupa interferon maka produksi kolagen akan mengalami hambatan (Qwarnstrom *et al.*, 1991).

Pertumbuhan kolagen serta fibroblast yang diamati pada anjing yang menderita dermatitis dan diberikan perlakuan selama 4 minggu dengan 2 jenis metode konsentrasi ecoenzym 10% dan ecoenzym 2% terlihat mengalami perubahan yang dimana tidak terlalu signifikan. Pada minggu awal yang dimulai dari minggu ke-0 hingga minggu ke-1, kondisi kolagen serta fibrosit dari anjing kelompok 1 mengalami penurunan, sedangkan pada anjing kelompok 2 terlihat fibrosit mengalami penurunan namun pada kolagen mengalami peningkatan. Penurunan jumlah ini disinyalir terjadi akibat penyesuaian tubuh anjing dalam melakukan adaptasi dan penyesuaian terhadap bahan ecoenzym. Lalu pada minggu ke-2, pada anjing kelompok 1 jumlah kolagen dari anjing lonto dan loni terlihat telah ada peningkatan sedikit dan pada anjing ciko masih mengalami penurunan, sedangkan pada jumlah fibrositnya semua mengalami penurunan. Pada anjing kelompok 2 terlihat kolagen serta fibrosit mengalami sedikit peningkatan. Pada kondisi ini anjing yang mengalami peningkatan telah berhasil beradaptasi dan kandungan ecoenzym perlahan mulai berefek untuk mengatasi dermatitis, sementara anjing yang jumlah kolagen serta fibroblast yang mengalami penurunan menandakan anjing masih mengalami tahap adaptasi. Hingga pada minggu terakhir di minggu ke-4, pada anjing kelompok 1 yaitu anjing lonto dan loni mengalami peningkatan jumlah kolagen, namun untuk anjing ciko justru mengalami penurunan kembali. Sedangkan pada fibrosit semua anjing meningkat. Pada kelompok 2, kolagen dari anjing lucy mengalami peningkatan sementara anjing momo mengalami penurunan, sedangkan pada jumlah fibrositpun demikian. Anjing lucy mengalami peningkatan dan anjing momo mengalami penurunan jumlah fibrosit. Pada minggu terakhir sempat terjadi perubahan musim menjadi musim hujan yang dimana ini menyebabkan kondisi kandang menjadi lebih lembab dari biasanya sehingga anjing mengalami adaptasi tambahan karena adanya perubahan lingkungan. Respon lain dari organisme terhadap rangsangan stres adalah aktivasi sistem saraf simpatik (SNS) (Elenkov dan Chrousos, 2002). Serat simpatis menginervasi semua jaringan hingga melepaskan norepinefrin (NE) dan asetilkolin sebagai neurotransmitter utama serta dapat memodulasi fungsi kekebalan serta sistem kekebalan kulit (Luger, 2002).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ecoenzym pada anjing dapat memperbaiki dermatitis berdasarkan pertumbuhan kolagen dan fibrosit. Secara umum pertumbuhan kolagen terjadi pada minggu ke-2 setelah pemberian ecoenzym.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jumlah hewan coba yang lebih banyak serta homogen agar dalam melihat variasi yang lebih banyak dalam percobaan selanjutnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Patologi Klinik serta Laboratorium Penyakit Dalam Universitas Udayana, Bali yang telah memfasilitasi penelitian ini sehingga berjalan sesuai yang diharapkan.

DAFTAR PUSTAKA

- DeBoer, D.J. (2005). Cutaneous adverse drug reaction. *Proceeding*. The North American Veterinary Conference.
- Elenkov, I.J., & Chrousos, G.P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of The New York Academy of Sciences*. 966(1): 290–303.
- Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., & Griffin, C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*. 11(196): 1-13
- Kastika, S. M., & Rahayu, R. (2018). Pengaruh Formula Obat Herbal Untuk Penyembuhan Luka Bakar. *Bioprospek*. 13(1): 26-32.
- Luger, T.A. (2002). Neuromediators, a crucial component of the skin immune system. *Journal of Dermatological Science*. 30(2): 87–93.
- Marsella, R. (2021). Atopic Dermatitis in Domestic Animals: What Our Current Understanding Is and How This Applies to Clinical Practice. *Veterinary Sciences*. 8(24): 1-18.
- Moriello, K.A. (2018). *Structure of the Skin in Dogs*. Department of Medical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison.
- Prasetyo, V. M., Ristiawati, T., & Philiyanti, F. (2021). Manfaat Eco Enzyme Pada Lingkungan Hidup Serta Workshop Pembuatan Eco Enzyme. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*. 1(1): 21-29.
- Qwarnstrom, E. E., Page, R. C., Gillis, S. & Dower, S. K. (1991). Binding, internalization and intracellular localization of interleukin-1 β in human diploid fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(17): 8261-8269.
- Suartha, I.N., Suarjana, I.G.K., & Sudimartini L.M. (2015). Efektivitas Kombinasi Ekstrak Daun Mimba, Daun Pegagan, dan Daun Sirsak Untuk Penanggulangan Penyakit Radang Kulit Kompleks. *Usulan Penelitian Unggulan*. Universitas Udayana
- Sudipa, P.H., Gelgel, K. T. P., & Jayanti, P. D. (2021). *Malassezia sp.* Infection Prevalence in Dermatitis Dog in Badung Area. *Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*. 5(2): 45-49.
- Triyono, B. (2005). Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi pada Tikus Wistar Yang diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang tidak diberi Levobupivakain. *Tesis*. Program Magister Biomedik dan PPDS I. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Vama, L., & Cherekar, M. N. (2020). Production, Extraction And Uses Of Eco-Enzyme Using Citrus Fruit Waste: Wealth From Waste. *Asian Journal of Microbiol. Biotech. Env. Science*. 22(2): 346-351.
- Wirata, G. (2019). *Perubahan Fibroblas Pada Penuaan*. Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

Tabel

Tabel 1. Jumlah kolagen dan fibrosit pada masing-masing hewan percobaan

Nama anjing	Jumlah kolagen/minggu				Rata-rata kolagen	Jumlah fibrosit/minggu				Rata-rata fibrosit
	0	1	2	4		0	1	2	4	
Lonto	83	50	66	66	66,25	509	460	230	484	420,75
Ciko	88	68	62	44	65,5	358	216	212	286	268
Loni	117	98	104	108	106,75	426	304	207	299	309
Momo	109	148	152	115	131	465	319	390	377	387,75
Lucy	104	106	106	107	105,75	407	270	300	466	360,75
Total	501	470	490	440	475,25	2165	1569	1339	1912	1746,25