



Original Article

Efektivitas *Ozonated Virgin Coconut Oil* terhadap Penyembuhan Luka *Full Thickness Skin Graft* Ditinjau dari Proliferasi *Endotel Progenitor Cell* dan Angiogenesis pada Tikus *Sprague Dawley*

Rollin Hansen Sidauruk¹, Renni Yuniati¹, Djoko Handojo²

¹Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

²Bagian Bedah Onkologi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v8i2.446>

Diajukan: 01 September 2020
Diterima: 29 Maret 2021

Afiliasi Penulis:
Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro

Korespondensi Penulis:
Rollin Hansen Sidauruk
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang,
Semarang, Jawa Tengah 50275,
Indonesia

E-mail:
rollin.sidauruk1988@gmail.com

Latar belakang : *Full thickness skin graft* merupakan salah satu tehnik dalam mempercepat penyembuhan luka. Proliferasi *Endotel Progenitor Cell* (EPC) dan pembentukan pembuluh darah baru memiliki peran penting dalam keberhasilan *Full thickness skin graft*. Kandungan ozon dalam *Ozonated Virgin Coconut Oil* (VCO) memiliki kemampuan dalam meningkatkan *growth factor* sehingga dapat mempercepat penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek *ozonated VCO* dalam berbagai dosis dalam meningkatkan proliferasi EPC dan angiogenesis pada luka *full thickness skin graft*.

Metode : Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan *randomized post test only with parallel group design*. Empat puluh ekor tikus *Sprague Dawley* dilakukan *skin graft autologous* pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 8 grup. Dua grup kontrol (X1 dan X5), dan 6 grup lagi lainnya diberikan *ozonated VCO* dosis bertingkat 50,6 mg/ml (X2, X6); 101,3 mg/ml (X3, X7); 202,6 mg/ml (X4, X8). Dilakukan terminasi pada hari ke-6 dan hari ke-12. Dilakukan pemeriksaan jumlah proliferasi EPC dengan pewarnaan IHC CD34 menggunakan pembesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi secara *single blind* serta jumlah angiogenesis dengan menggunakan mikroskop binokuler pembesaran 100x dengan pewarnaan HE pada masing-masing grup. Data dianalisis dengan metode *Saphiro Wilk*, ANOVA, *post-hoc* Benferonni dan *Pearsons* menggunakan SPSS.

Hasil : Jumlah proliferasi EPC pada kelompok X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 masing-masing memiliki rerata $6,2 \pm 0,837$; $10 \pm 1,581$; $13,80 \pm 2,049$; $14,80 \pm 2,280$; $9,40 \pm 2,074$; $13,20 \pm 1,483$; $19,0 \pm 2,055$ dan $19,20 \pm 1,095$ lapang pandang mikroskop. Jumlah angiogenesis pada kelompok X5, X6, X7, X8 memiliki rerata $9,20 \pm 1,095$; $14,60 \pm 2,881$; $17,40 \pm 3,286$; $18,80 \pm 2,168$. Pemberian *ozonated VCO* dosis 202,5 mg/ml memberikan hasil terbaik dalam jumlah proliferasi EPC ($p \leq 0,01$) dan jumlah angiogenesis ($p \leq 0,001$).

Simpulan : *Ozonated VCO* efektif dalam penyembuhan luka *full thicknes skin graft* ditinjau dari proliferasi EPC dan angiogenesis. Dosis *ozonated VCO* 202,5 mg/ml memiliki efek terbaik terhadap penyembuhan luka.

Kata kunci : *Full thicknes skin graft, ozonated virgin coconut oil, endotel progenitor cell, angiogenesis*

The Effectivity of Ozonated Virgin Coconut Oil on Healing Full Thickness Skin graft Study on Endothelial Progenitor Cell Proliferation and Angiogenesis in Sprague Dawley Mice

Abstract

Background : Full thickness skin graft is one technique to accelerate wound healing. Endothelial Progenitor Cell (EPC) proliferation and new blood vessel formation have an important role in the success of Full thickness skin graft. Ozone content in ozonated virgin coconut oil (VCO) has the ability to increase growth factors so that it can accelerate wound healing. This study was aimed to prove the effects of ozonated VCO in various doses in increasing EPC proliferation and angiogenesis in full thickness skin graft wounds.

Methods : This research is an experimental study with randomized post test only with parallel group design. 40 Sprague Dawley rats performed autologous Skin grafts at the same time. Samples were randomly divided into 8 groups, two control groups (X1 and X5), and 6 other groups were given a multi-dose ozonated VCO 50.6 mg/ml (X2, X6); 101.3 mg/ml (X3, X7); 202.6 mg/ml (X4, X8). Conduct termination on day 6 and day 12. The number of EPC proliferation was examined with IHC CD34 staining using 1000x magnification with the aid of emersion oil. The amount of angiogenesis was examined using 100x magnification of binocular microscope with HE staining in each group. Data were analyzed by Saphiro Wijk, ANOVA, post hoc benferonni and pearsons with SPSS.

Results : The number of EPC proliferation in groups X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 has a mean of 6.2 ± 0.837 ; 10 ± 1.581 ; 13.80 ± 2.049 ; 14.80 ± 2.280 ; 9.40 ± 2.074 ; 13.20 ± 1.483 ; 19.0 ± 2.055 and 19.20 ± 1.095 . The number of angiogenesis in groups X5, X6, X7, X8 has a mean of 9.20 ± 1.095 ; 14.60 ± 2.881 ; 17.40 ± 3.286 , 18.80 ± 2.168 , 17.40 ± 3.286 , 18.80 ± 2.168 . The administration of ozonated VCO dose of 202.6 mg/ml gave the best results in the amount of angiogenesis ($p \leq 0.001$).

Conclusion : Ozonated VCO can increase the number of EPC proliferation and angiogenesis in the wound healing process of full thickness skin graft. The ozonated VCO dose of 202.6 mg / ml showed the best effect on increase wound healing process.

Keyword s : Full thicknes skin graft, ozonated virgin coconut oil , endotel progenitor cell, angiogenesis

PENDAHULUAN

Luka merupakan terputusnya kontinuitas integritas kulit, permukaan mukosa ataupun organ jaringan.¹ Secara khusus berdasarkan kedalaman luka ataupun struktur lapisan kulit, luka dapat dibagi menjadi 3 yaitu superfisial, *partial thickness*, dan *full thickness*.^{1,2} Penanganan luka saat ini merupakan permasalahan global dan dapat menimbulkan komplikasi yang berat jika tidak ditangani dengan baik. Di Amerika Serikat, lebih dari 7 juta orang setiap tahun mengalami peradangan kronis pada kulit yang disebabkan oleh tekanan, stasis vena, atau diabetes mellitus yang memperparah kondisi luka. Proses fisiologis dalam penyembuhan luka dimulai dari hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*.¹ Beberapa proses yang terjadi pada penyembuhan luka diantaranya munculnya *endothel progenitor cell* (EPC) yang terjadi akibat kerusakan endotel sehingga akan memicu proses vaskulogenesis dan proses angiogenesis. Selain itu saat proses penyembuhan luka terjadi epitelisasi luka yang dimulai dari deposit kolagen, pembentukan jaringan granulasi, kontraksi luka dan penutupan luka.^{1,2} Proses penyembuhan luka dapat dipengaruhi oleh teknik penanganan dan perawatan luka.^{2,3} *Skin graft* merupakan tindakan memindahkan sebagian atau seluruh tebalnya kulit dari satu tempat ke tempat lainnya supaya hidup di tempat baru tersebut dan dibutuhkan revaskularisasi untuk menjamin kelangsungan hidup kulit yang

dipindahkan tersebut. Metode ini digunakan dalam penutupan defek kulit yang luas untuk rekonstruksi pada operasi plastik.^{4,5} Berdasarkan ketebalannya *skin graft* dibagi menjadi 2 yaitu *split thickness skin graft* (STSG) dan *full thickness skin graft* (FTSG).^{4,6} Namun dalam pelaksanaannya banyak faktor yang dapat menjadi permasalahan dalam melakukan FTSG.⁶

Oksigen merupakan modalitas penting yang membantu dalam penanganan luka. Ozon (O₃) telah diakui secara luas memiliki efek bakterisida yang terbaik, antiviral, dan anti jamur serta saat ini secara empiris telah digunakan sebagai modalitas terapi klinis untuk luka kronis, seperti ulkus tropik dan ulkus iskemik. Tiga atom oksida yang dimiliki oleh ozon jika dilepaskan akan berikatan dengan oksida bebas dalam tubuh dan menghasilkan produk oksigen yang akan memberikan efek positif bagi tubuh. Efek menguntungkan dari perawatan luka dengan menggunakan ozon akan memberikan dampak terhadap penurunan infeksi bakteri dan penyembuhan kerusakan kulit yang terganggu atau peningkatan tekanan oksigen oleh paparan ozon di area luka.⁷ Ozon berpotensi sebagai alternatif dalam membantu penyembuhan luka pada kulit. Ozon bereaksi pada setiap organ dan permukaan tempat berkontakannya seperti sel endotel. Dengan dasar inilah, masih diperlukan penelitian lebih lanjut tentang ozon yang akan mengalami pemecahan menjadi oksigen, dan apakah hal ini akan meningkatkan penyembuhan luka pada keadaan FTSG jika diberikan secara topikal.

METODE

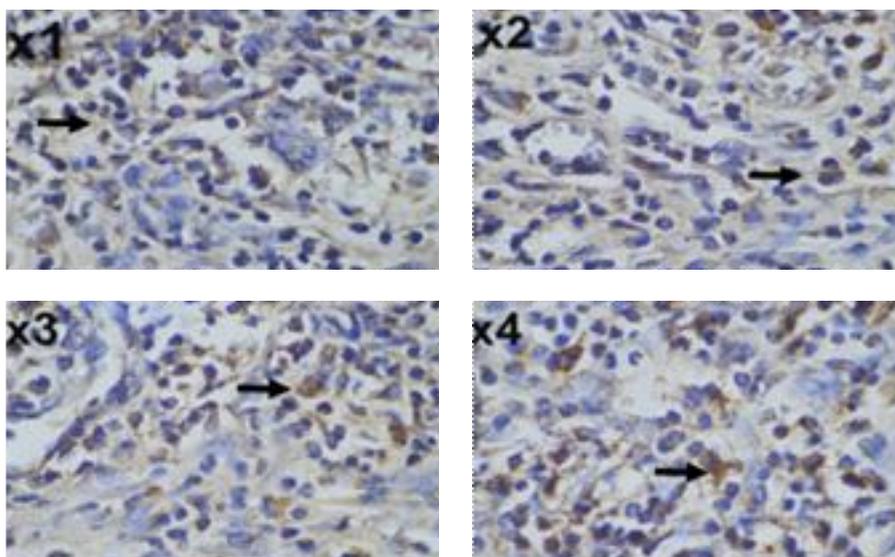
Penelitian ini merupakan studi eksperimental hewan dengan desain “*randomized post-test with control group*” pada 40 ekor tikus jantan *Sprague Dawley* yang diinsisi pada punggung kanannya dengan panjang luka 2cm x 2cm dan kedalaman luka 2mm. Kriteria inklusi penelitian ini yaitu tikus jantan berumur ±2-3 bulan, dengan berat badan 250 ± 50 gram setelah aklimatisasi, serta tidak ada kelainan anatomis. Semua subjek diperlakukan secara sama dari segi paska operasi dan diet dalam jumlah normal. Subjek hewan percobaan dibagi secara acak menjadi delapan grup sama rata dengan jumlah masing-masing kelompok 5 ekor (2 kelompok kontrol dan 6 kelompok intervensi), yaitu kelompok kontrol 1 (X1) diberikan perawatan dengan NaCl 0,9% 1 kali sehari selama 6 hari dan kelompok kontrol 2 selama 12 hari (X5). Kelompok perlakuan diberikan *ozonated VCO* dengan dosis bertingkat yaitu 50,6 mg/ml (X2,X6); 101,3mg/ml (X3,X7); dan 202,6mg/ml (X4,X8). Pada penelitian ini tidak ada subjek penelitian yang *drop out*. *Ozonated VCO* diperoleh dari pencampuran antara ozon dan VCO. Pembuatan *ozonated VCO* dilakukan di *center plasma research* Universitas Diponegoro, Semarang. Sedangkan proses pembuatan luka dan penerapan *full thickness skin graft* terhadap tikus, serta proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Diponegoro (UNDIP), Semarang. Pada hari ke-6, terminasi dilakukan pada kelompok X1, X2, X3 dan X4 dan hari ke 12 terminasi dilakukan pada kelompok X5, X6, X7 dan X8. Kemudian jaringan luka diambil dan dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis. Pemeriksaan jumlah proliferasi EPC dengan pewarnaan IHC CD34 menggunakan

pembesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi secara *single blind*. Sedangkan pemeriksaan jumlah angiogenesis dengan cara menghitung jumlah percabangan baru pada jaringan luka yang memiliki tunika intima yang tipis dan tidak memiliki tunika media pada 5 lapang pandang menggunakan mikroskop binokuler pembesaran 100x dengan pewarnaan HE pada masing-masing grup. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan progam SPSS 21.0.

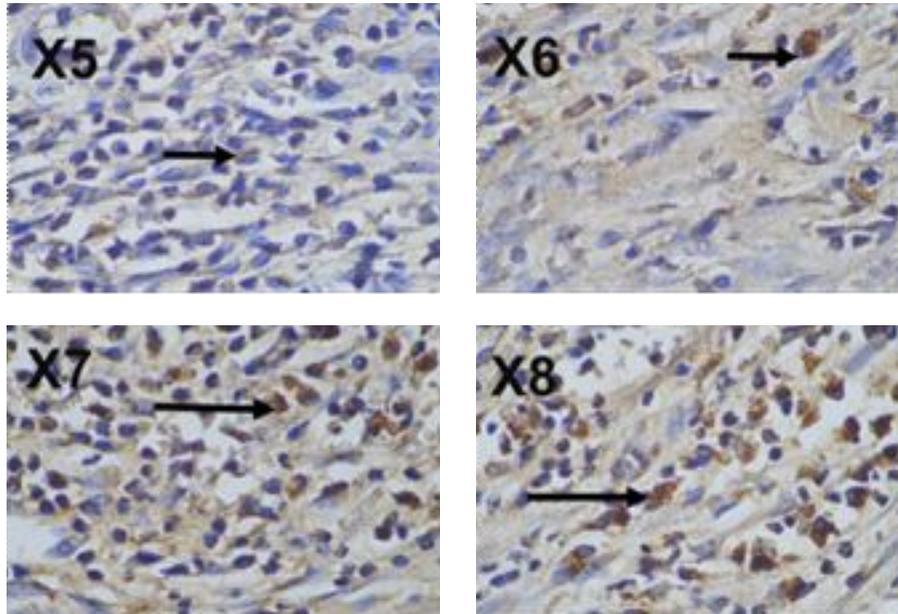
HASIL

Setelah dilakukan pengambilan jaringan, jaringan diberikan pengecatan immunohistokimia CD34. Pembacaan preparat jaringan dilakukan oleh patalog pada setiap kelompok dengan *single blind*.

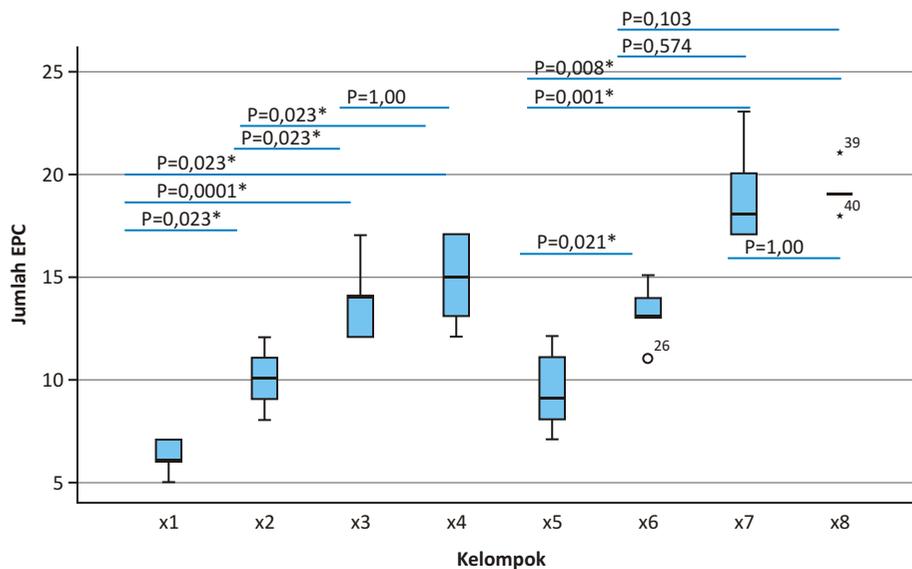
Grafik 1 menunjukkan bahwa adanya perbedaan jumlah *endothel progenitor cell* pada masing-masing kelompok dengan kelompok yang diberikan NaCl 0,9% 1 kali sehari selama 6 hari yaitu 6,2 ± 0,837 lapang pandang mikroskop; kelompok yang diberikan *ozonated VCO* topikal 50,6 mg/ml selama 6 hari yaitu 10 ± 1,581 lapang pandang mikroskop; kelompok yang diberikan *ozonated VCO* topikal 101,3 mg/ml selama 6 hari yaitu 13,80 ± 2,049 lapang pandang mikroskop; kelompok yang diberikan *ozonated VCO* topikal 202,6 mg/ml selama 6 hari yaitu 14,80 ± 2,280 lapang pandang mikroskop; kelompok yang diberikan NaCl 0,9% selama 12 hari yaitu 9,40 ± 2,074 lapang pandang mikroskop; kelompok yang diberikan *ozonated VCO* topikal 50,6 mg/ml selama 12 hari yaitu 13,20 ± 1,483 lapang pandang mikroskop; kelompok yang diberikan *ozonated VCO* topikal 101,3 mg/ml dan 202,6 mg/ml selama 12 hari yaitu 19,0 ± 2,055 dan 19,20 ± 1,095 lapang pandang mikroskop.



Gambar 1. Gambaran Proliferasi EPC pada hari ke 6 perawatan (menggunakan pewarnaan IHC CD34 dengan pembesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi)



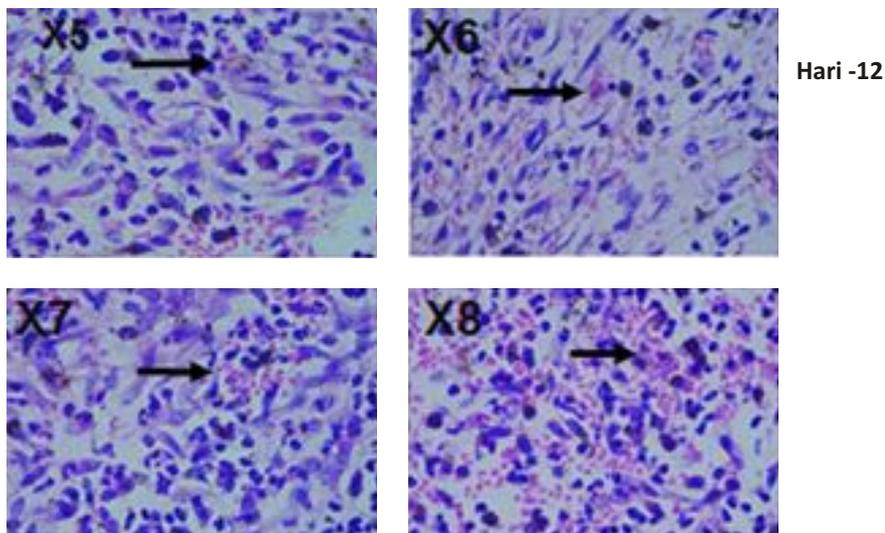
Gambar 2. Gambaran Proliferasi EPC pada hari ke 12 perawatan (menggunakan pewarnaan IHC CD34 dengan pembesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi)



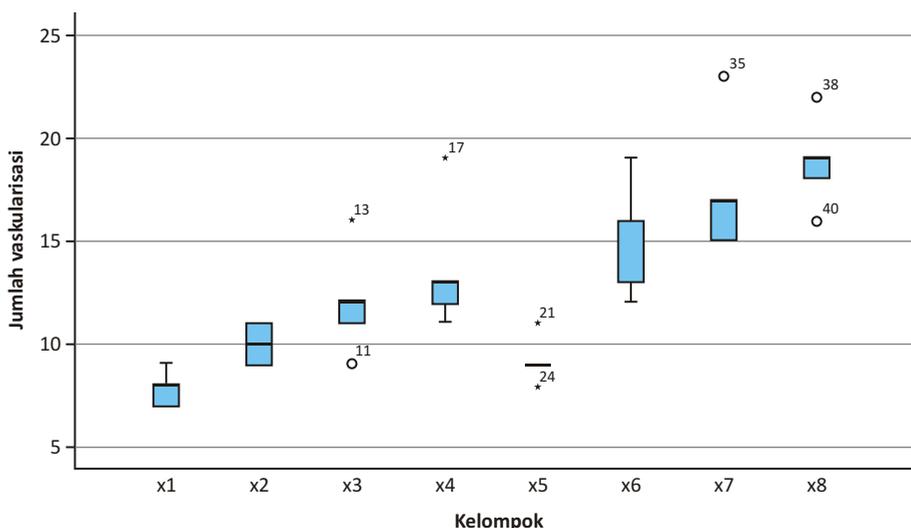
Grafik 1. Grafik box plot data Jumlah Proliferasi EPC pada kelompok X1 – X8

EPC : Endothelial Progenitor Cell

- X1 : kelompok kontrol yang diberi NaCl 0,9% dan diterminasi pada hari ke-6
- X2 : kelompok yang diberi ozonated VCO 50,6 mg/ml dan diterminasi pada hari ke-6
- X3 : kelompok yang diberi ozonated VCO 101,3 mg/ml dan diterminasi pada hari ke-6
- X4 : kelompok yang diberi ozonated VCO 202,6 mg/ml dan diterminasi pada hari ke-6
- X5 : kelompok kontrol yang diberi NaCl 0,9% dan diterminasi pada hari ke-12
- X6 : kelompok yang diberi ozonated VCO 50,6 mg/ml dan diterminasi pada hari ke-12
- X7 : kelompok yang diberi ozonated VCO 101,3 mg/ml dan diterminasi pada hari ke-12
- X8 : kelompok yang diberi ozonated VCO 202,6 mg/ml dan diterminasi pada hari ke-12



Gambar 3. Gambaran Angiogenesis (Pembuluh darah baru) pada kelompok penelitian (Menggunakan pewarnaan HE dengan pembesaran 1000x)



Grafik 2. Grafik box plot data Jumlah Angiogenesis pada kelompok X1–X8

Berdasarkan hasil uji *One Way* ANOVA didapatkan nilai $p=0,00$, maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna jumlah proliferasi EPC pada kelompok yang diberikan NaCl 0,9% 1x sehari selama 6 hari, kelompok yang diberikan ozonated VCO topikal 50,6 mg/ml selama 6 hari, kelompok yang diberikan ozonated VCO topikal 101,3 mg/ml selama 6 hari dan kelompok yang diberikan ozonated VCO topikal 202,6 mg/ml selama 6 hari.

Pembuluh darah baru yang muncul dapat dibedakan dengan pembuluh darah lama dengan melihat tunika media. Dari grafik 2, menunjukkan bahwa adanya perbedaan jumlah angiogenesis pada masing-masing kelompok kontrol dengan kelompok yang

diberikan perlakuan. Jumlah pembuluh darah baru yang muncul paling banyak terdapat pada kelompok X8. Berdasarkan hasil uji *One Way* ANOVA didapatkan nilai $p=0,00$, maka dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna jumlah angiogenesis pada kelompok yang diberikan NaCl 0,9% selama 12 hari, kelompok yang diberikan ozonated VCO topikal 7,59 mg selama 12 hari, kelompok yang diberikan ozonated VCO topikal 15,195 mg dan 30,375 mg selama 12 hari.

DISKUSI

Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektivitas pemberian ozonated virgin coconut oil (VCO) secara topikal

dalam meningkatkan respon penyembuhan luka pada FTSG kulit *Sprague Dawley* ditinjau dari proliferasi EPC dan jumlah angiogenesis dimana dilakukan perlakuan selama 6 dan 12 hari. Kemudian dilihat dengan pewarnaan staining IHC CD34 untuk melihat jumlah proliferasi EPC dan angiogenesis melalui pewarnaan HE. Peneliti menggunakan ozonated VCO yang dihasilkan dari generator yang akan dicampurkan ke dalam VCO, karena kandungan senyawa VCO efektif dalam mengatasi inflamasi pada setiap luka. VCO secara topikal dapat berguna sebagai pelindung pada kulit dari radikal bebas dan dapat melembabkan kulit. Polifenol yang terkandung dalam VCO diketahui dapat berperan sebagai antioksidan. VCO dapat mempercepat waktu penyembuhan luka, mengecilkan ukuran diameter luka serta menurunkan serum alkaline phosphatase. VCO dapat menurunkan puncak konsentrasi TNF- α , IL- β , dan IL-6.⁸⁻¹⁰

Tiap kelompok diberikan perlakuan dengan menggunakan ozonated VCO dengan dosis yang berbeda-beda. Pada kelompok dengan pemberian ozonated VCO dosis 15,195 mg (101,3 mg/ml) dan 30,375mg (202,5 mg/ml) menunjukkan jumlah proliferasi EPC yang lebih tinggi dan kelompok yang dilakukan pemberian ozonated VCO dosis 202,4 mg/ml menunjukkan jumlah angiogenesis yang lebih tinggi. Hal tersebut sejalan dengan teori yang menyebutkan bahwa ozon akan menghasilkan produk H₂O₂ dan ROS. ROS yang dihasilkan oleh ozon akan mengaktifasi ekspresi gene Nitric oxide synthase sehingga akan meningkatkan pembentukan nitric oxide. Nitric oxide akan merangsang endothel untuk berproliferasi melalui eNOS. eNOS akan mengirimkan sinyal dan akan mengaktifasi EPC dari *bone marrow* dan akan memobilisasi EPC ke pembuluh darah perifer.¹¹⁻¹⁴ Ozon juga akan meningkatkan jumlah fibroblast, kolagen dan kadar VEGF yang merupakan komponen penting dalam proses angiogenesis. Ozon akan berperan untuk memanggil sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 untuk menimbulkan kaskade penyembuhan dengan mendorong terstimulasinya VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) dan memastikan suplai fibroblast dapat mencapai tujuan agar bisa menciptakan kolagen untuk perlekatan donor.^{11-12,15-17}

Penelitian ini juga memiliki beberapa kekurangan seperti bahan yang diuji hanya pada beberapa mediator inflamasi serta VCO sebagai bahan pelarut ozon dapat memberikan bias hasil dikarenakan VCO juga mempunyai efek anti inflamasi dan mempercepat penyembuhan luka.

SIMPULAN

Pemberian ozonated VCO dapat mempercepat penyembuhan luka *full thickness skin graft* yang dapat dilihat berdasarkan indikator jumlah proliferasi *endothel*

progenitor cell dan angiogenesis dibandingkan dengan pemberian NaCl 0,9%. Dosis terbaik untuk penyembuhan luka *full thickness skin graft* adalah 202,6 mg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1528-42
2. Geoffrey C, Victor W. Wound Healing: Normal and Abnormal. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2014; 20-35.
3. Harper D, Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Basic Science. Surgery* 2014;32(9):445-50.
4. Lee CK, Hansen SL. Management of acute wound. *Surg Clin North Am*. 2009; 89(3):659-76.
5. Thorne CH. Technique and Principles in Plastic Surgery. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 7 ed. Philadelphia: Lippincott William . Wilkins. 2014; 1-19.
6. I. C. Valencia, A. F. Falabella, W. H. Eaglstein. Skin grafting. *Dermatologic Clinics* 2000;18(3.):521-32.
7. Kim, H.S., Noh, S.U., Han, Y.W., Kim, K.M., Kang, H., Kim, H. O, *et al*. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozon on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci*. 2009; 24: 368-74.
8. Aggarwal B, Lamba HS, Sharma P, Ajeer. Various Pharmacological Aspects of Cocos nucifera-A Review. *J Pharmacol Sci*. 2017; 5:25-30.
9. Rajagukguk H, Syukur S, Ibrahim S, Syafrizayanti S. Beneficial Effect of Application of Virgin Coconut oil (VCO) Product from Padang West Sumatra, Indonesia on Palatoplasty Wound Healing. *ASRJETS*. 2017; 34:231-6.
10. GhaniNAA, Channip A-A, Hwa PCH, Ja'Faar F, Yasin HM, Usman A. Physicochemical properties, antioxidant capacities, and metal content of virgin coconut oil produced by wet and dry processes. *Food Sci Nutr J*. 2018; 6:1298-306.
11. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozon Therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res J*. 2017; 7(3): 212-219.
12. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Sticozzi C, *et al*. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Int J Pharm*. 2013; 458(1):65-73.
13. George, A. L., Bangalore-Prakash, P., Rajoria, S., Suriano, R., Shanmugam, A., Mittelman, A. *et al*. Endothelial Progenitor Cell Biology In Disease And Tissue Regeneration. *J Hematol Oncol* 2011;4(1):24-31.
14. Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, MD, *et al*. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(2): 89-95.
15. Tepper O, Capla J, Galiano R, Ceradini D, Callaghan M, Kleinman M, *et al*. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005;105(3):1068-7.
16. Li W, Liu ZQ, Wei J, Liu Y, Hu LS. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review). *International J of Molecular Medicine* 2012;30(5):1000-6.
17. Yang Y, Qi PK, Yang ZL, Huang N. Nitric oxide based strategies for applications of biomedical devices. *Biosurface and Biotribology* 2015;177201.