



Original Article

Efektivitas Ozonated VCO terhadap Penyembuhan Luka *Full Thickness Skin Graft Autolog* Tikus *Sprague Dawley*

Johan Rinto Even¹, Hardian², Najatullah³

¹Program Studi Bedah Umum Universitas Diponegoro

²Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

³Bagian Bedah Plastik RSUP Dr. Kariadi, Semarang

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v8i1.447>

Diajukan: 13 Agustus 2020
Diterima: 12 Oktober 2020

Afiliasi Penulis:
Program Studi Bedah Umum, Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro

Korespondensi Penulis:
Johan Rinto Even
Jl. Dr. Sutomo No.16, Semarang,
Jawa Tengah 50244,
Indonesia

E-mail:
dokterjohan@yahoo.co.id

Latar belakang : Tatalaksana luka memiliki berbagai tingkatan metode yang dapat dilakukan sesuai dengan grading luka itu sendiri. *Skin graft* saat ini menjadi salah satu terapi pilihan pada proses penyembuhan luka yang selalu berkembang. Proses pembentukan fibroblas dan pembentukan *growth factor* seperti VEGF memiliki peran penting dalam penyembuhan luka *skin graft*. Minyak VCO yang telah terozonasi memiliki peran yang penting dalam penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan membuktikan efek VCO terozonasi dalam berbagai dosis dalam meningkatkan jumlah proliferasi fibroblas dan ekspresi VEGF pada luka *skin graft*.

Metode : Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan "*Randomized parallel study with controlled group design*" terhadap 40 ekor tikus *Sprague Dawley* dilakukan *skin graft autolog* pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 8 grup (K1 dan K2 = tanpa pemberian kafein), (A1 dan A2 = ozonated VCO 50,4 mg/ml), (B1 dan B2 = ozonated VCO 103,2 mg/ml), (C1 dan C2 = ozonated VCO 204 mg/ml). Penilaian jumlah fibroblast dilakukan dengan pengecatan *hematoxylin & eosin* pada hari ke 6 dan 12, dan ekspresi VEGF dilakukan dengan pengecatan *imunohistokimia* setelah hari ke 6 dan 12 pasca *skin graft*.

Hasil : Uji statistik perbandingan jumlah fibroblast pada hari ke 6 didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 vs A1 ($p = 0,029$), K1 vs B1 ($p = 0,004$), K1 vs C1 ($p = 0,000$), pada hari ke 12 didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K2 vs A2 ($p = 0,029$), K2 vs B2 ($p = 0,010$), K2 vs C2 ($p = 0,001$). Analisis statistik perbandingan ekspresi VEGF pada hari ke 6, didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 vs A1 ($p = 0,024$), K1 vs B1 ($p = 0,005$), K1 vs C1 ($p = 0,001$), pada hari ke 12 didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K2 vs A2 ($p = 0,011$), K2 vs B2 ($p = 0,036$), K2 vs C2 ($p = 0,004$).

Simpulan : Ozonated VCO efektif terhadap peningkatan jumlah fibroblas dan ekspresi VEGF jaringan pada proses penyembuhan luka *full thickness skin graft autolog* tikus *Sprague Dawley*.

Kata kunci : Ozonated VCO, *full thickness skin graft*, fibroblas, VEGF

Effectiveness of ozonated VCO for wound healing in autologous full thickness skin graft in Sprague Dawley Rats

Abstract

Background : Now, Skin grafts are one of the therapies of choice in the wound healing process. And this is still developing today. The process of formation fibroblas and the formation of vascular endothelial growth factor have an important role in healing skin graft wounds. Ozonated virgin coconut oil has an important role in wound healing. Tje objectives of this study was to prove the effect of ozonated virgin coconut oil in various doses in increasing number of fibroblas and expression of vascular endothelial growth factor of skin graft wounds.

Methods : This study is an experimental study with "Randomized parallel study with controlled group design" on 40 Sprague Dawley rats which are performed an autologous skin graft at the same time. Samples were divided randomly into 8 groups (K1 and K2 = without ozonated VCO), (A1 and A2 = ozonated VCO 50,4 mg/ml), (B1 and B2 = ozonated VCO 103,2 mg/ml), (C1 and C2 = ozonated VCO 204 mg/ml). Evaluation of the amount of fibroblas was done by staining hematoxylin & eosin after the 6th day and the expression of vascular endothelial growth factor was done by staining immunohistochemistry after the 12th day after skin graft.

Results : Statistical analysis of the amount of fibroblas after the 6th day was found to be significantly different between the K1 vs A1 group ($p = 0.029$), K1 vs B1 ($p = 0.004$), K1 vs C1 ($p = 0.000$), on the 12th day was found significantly different the amount of fibroblast between K2 vs A2 ($p = 0,029$), K2 vs B2 ($p = 0.010$), K2 vs C2 ($p = 0.001$). The expression of vascular endothelial growth factor on the 6th day was found a significant difference between the K1 vs A1 group ($p = 0.024$), K1 vs B1 ($p = 0.005$), K1 vs C1 ($p = 0.001$), on the 12th day was found significantly different the expression of vascular endothelial growth factor between K2 vs A2 ($p = 0,011$), K2 vs B2 ($p = 0,036$), K2 vs C2 ($p = 0.004$).

Conclusion : Ozonated VCO can increase the amount of fibroblas and expression of vascular endothelial growth factor in the wound healing process of autologous skin graft in Sprague Dawley rats.

Keywords : Ozonated VCO, full thickness skin graft, fibroblas, VEGF.

PENDAHULUAN

Luka merupakan hilangnya atau terputusnya kontinuitas jaringan yang disebabkan berbagai faktor baik internal maupun eksternal.¹ Berdasarkan insidensi, luka bakar merupakan jenis luka yang paling banyak membutuhkan penanganan bedah secara serius.² Tahun 2008, lebih dari 410.000 kasus luka bakar terjadi di Amerika Serikat, dimana sekitar 40.000 kasus butuh perawatan di rumah sakit.³ Data yang didapatkan dari RSUPN Cipto Mangunkusumo tahun 2004, dilaporkan 107 kasus luka bakar yang dirawat dengan angka kematian 37,38%.⁴ Di Bali khususnya pasien yang dirawat di RSUP Sanglah Denpasar pada tahun 2012 sebanyak 103 orang dirawat dengan luka bakar. Dari 103 orang yang dirawat, sebanyak 48 orang dilakukan tindakan *skin graft*.⁴ Dewasa ini model terapi *Skin graft* merupakan salah satu pilihan terapi yang sering digunakan, *skin graft* merupakan suatu langkah untuk menutup defek yang tidak dapat ditutup secara primer. Tindakan ini memindahkan sebagian atau seluruh tebalnya kulit dari satu tempat ke tempat lainnya sehingga bisa hidup di tempat baru tersebut dan membutuhkan suplai darah baru untuk menjamin kelangsungan hidupnya.⁵ Berdasarkan ketebalannya, graft dibagi menjadi *split thickness skin graft* (STSG) yaitu graft yang mengandung epidermis dan sebagian dermis, dan *full thickness skin graft* (FTSG) yaitu graft yang mengandung epidermis dan seluruh ketebalan dermis.⁶ Ozon berpotensi sebagai alternatif yang potensial untuk dijadikan agen yang membantu penyembuhan luka pada

kulit. Ozon bereaksi pada setiap organ dan permukaan tempat berkontakannya (misalnya sel endotel).⁷⁻¹⁰

Sampai saat ini masih terbatasnya penelitian terapi krim ozon pada hewan coba dengan model *full thickness skin graft* dan belum adanya penelitian berupa uji klinis mengenai keamanan penggunaan krim ozon untuk terapi *full thickness skin graft* di Indonesia, sehingga peneliti bermaksud untuk melakukan penelitian tersebut. Pemberian *ozonated virgin coconut oil* diduga dapat meningkatkan proliferasi VEGF dan meningkatkan jumlah fibroblas pada pengaplikasian *full thickness skin graft* pada tikus Sprague Dawley.

METODE

Dalam penelitian ini, digunakan hewan coba dengan menerapkan *animal ethics*, yang diperoleh dengan cara pengajuan persetujuan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan No.56/EC/H/KEPK/FK-UNDIP/V/2019. Seluruh hewan coba diberi perlakuan dan dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang. Semua tikus diperlakukan secara sama dari segi post operatif, diet dalam jumlah sama dan minum *ad libitum*, masing-masing kelompok dikandangan secara individual.

Desain penelitian merupakan eksperimental dengan "*Randomized paralel study with control group design*". Pembuatan *ozonated virgin coconut oil* dilakukan di *Center Plasma Research* Universitas Diponegoro. Proses pembuatan luka dan penerapan *full thickness skin graft* terhadap tikus, serta proses pengambilan jaringan

dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Brawijaya, Malang. Proses pembuatan preparat, pewarnaan HE serta pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 minggu. Penelitian ini dilakukan selama Februari 2019 – Mei 2019.

Populasi penelitian melibatkan 2 kelompok besar yang terdiri dari satu grup kontrol dan tiga grup intervensi dalam 1 kelompok besar dan setiap kelompok mempunyai kesamaan dalam perlakuan namun memiliki perbedaan dalam hal lama waktu pengamatan. FTSG akan dilakukan pada semua grup. Semua subjek akan diperlakukan secara sama dari segi post operatif dan pemberian *ozonated virgin coconut oil topical*. Kriteria inklusi sampel penelitian yaitu tikus *Sprague Dawley* jantan, kondisi sehat (bergerak aktif). Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah tikus jantan *Sprague Dawley* berumur $\pm 2-3$ bulan, berat badan 140 ± 150 gram setelah aklimatisasi, tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak, tikus *Sprague Dawley* jantan menunjukkan perubahan perilaku (aktivitasnya tampak lemah dan malas). Perkiraan total sampel pada penelitian ini sejumlah 40 tikus jantan jenis *Sprague Dawley* dewasa dengan berat 140 ± 150 gram yang diberikan perlakuan luka.

Pembuatan Full Thickness Skin Graft

Full thickness skin graft dilakukan dengan cara membuat sayatan dan dibuat luka dengan diameter 2 cm ke badan tikus yang telah dicukur bulunya. Kulit donor diambil dengan memotong kulit punggung kontra lateral sampai dasar. Luka dibersihkan sampai dasar dengan *povidone iodine*. Bagian ventral dan dorsal jaringan yang diambil dipisahkan secara perlahan dengan forcep kecil. Jaringan bagian dorsal ditaruh ke dalam carian NaCl 0,9% yang di bawahnya telah ditaruh es batu. Jaringan ventral tidak dipakai. Kulit donor dipindahkan dan dikeringkan dari *saline* dingin dengan kassa steril. *Graft* ditempelkan pada

daerah luka, lalu difiksasi dengan benang ukuran 5.0. Sampel dipelihara dalam suhu ruang $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ dengan pencahayaan lampu dari pukul 09.00 – 21.00 dan diberikan makan secukupnya.

Pembuatan Ozonated Virgin Coconut Oil

Ozonated virgin coconut oil diperoleh dari laboratorium Plasma Research Universitas Diponegoro, yang didapatkan dari hasil generator ozon. Ozon yang dihasilkan dari generator dicampurkan ke dalam *Virgin Coconut Oil (VCO)*. Alat yang digunakan untuk pembuatan minyak berozon adalah generator ozon dan pengaduk magnetis (*magnetic stirrer*). Minyak yang digunakan adalah minyak VCO sebanyak 40 ml. Variasi dosis konsentrasi ozon adalah 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml. Generator ozon digunakan dengan kapasitas 50 gr/jam. VCO diberikan tekanan Ozon pada kecepatan tetap 1,5 liter per menit dengan konsentrasi ozon 45 mg/L selama 45 menit, 60 menit dan 120 menit.

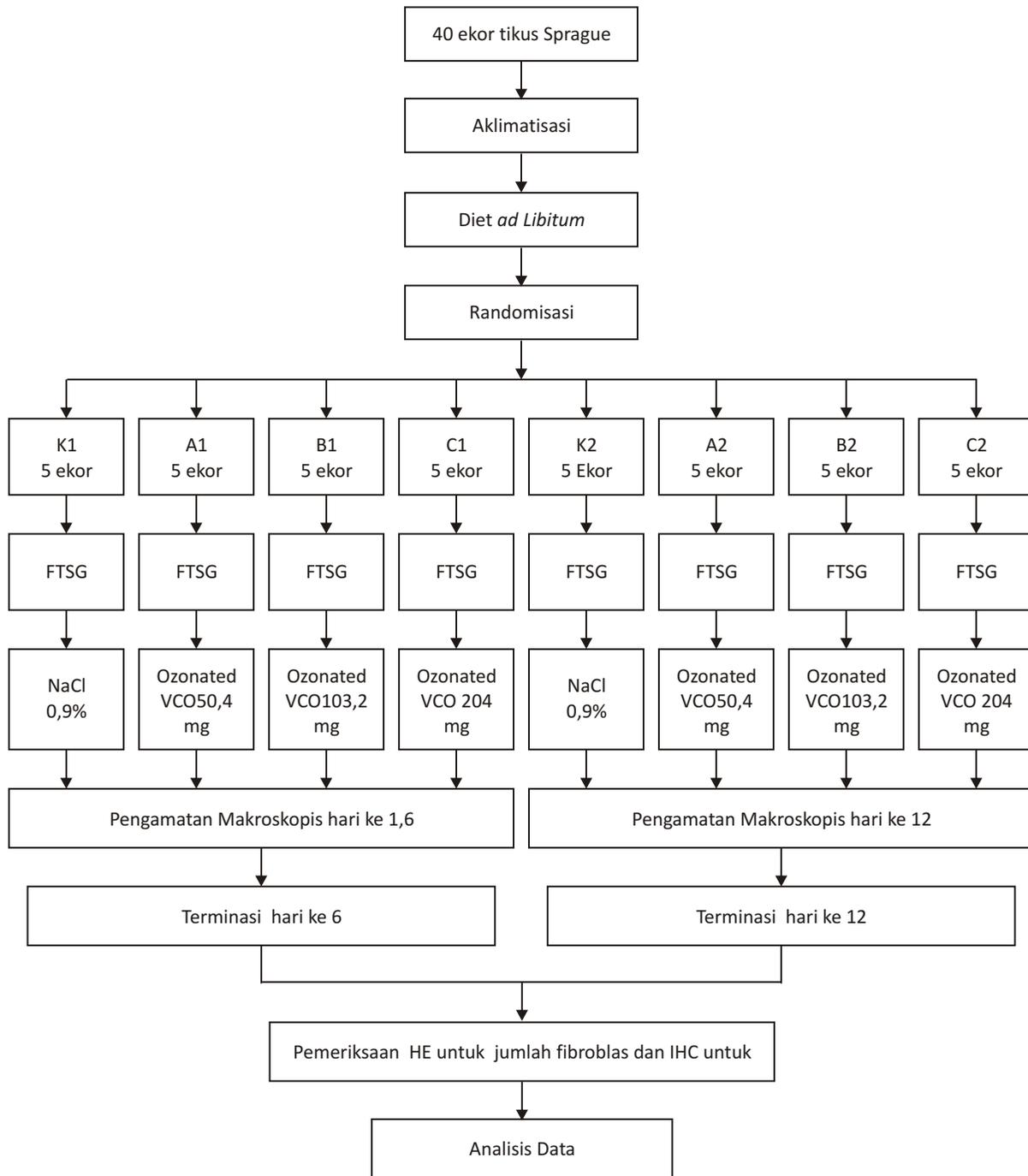
Persiapan Hewan Percobaan

Induksi luka pada tikus dilakukan di area dorsum tikus dengan ukuran 2 cm x 2 cm x 5 mm. Kulit donor dilakukan dengan memotong kulit punggung sampai dasar dari *panniculus carnosus*. Kulit *graft* dan *bed graft* dibersihkan dari jaringan lemak dan jaringan pengikat secara lembut. Kulit *graft* yang telah bersih dan kering diletakkan ke *bed graft* dengan memutar 180° dari posisi awal sebelum pengambilan kulit *graft*. Kemudian dilakukan penjahitan secara interuptus pada tengah *graft*, kemudian ke empat sudut *graft*, diikuti dengan dua jahitan pada masing-masing sisi *graft* menggunakan benang *T-lene 5-0*.

Setelah dilakukan FTSG, luka pada tikus dibersihkan dengan normal *saline*. Tikus diberi perlakuan sesuai kelompok perlakuan. *Induksi Full thickness skin graft* dilakukan pada hari yang sama, dan 8 kelompok tersebut akan diberi label K1, A1, B1, C1, K2, A2, B2 dan C2. Kelompok K1, A1, B1 dan C1 akan mendapat perlakuan hingga hari ke 6 lalu diterminasi, sedangkan



Gambar 1. Teknik pembuatan *full thickness skin graft autolog*.(dokumentasi pribadi)



Gambar 2. Alur penelitian

kelompok ke K2, A2, B2 dan C2 diterminasi pada hari ke 12. Kelompok K1 dan K2 merupakan kelompok kontrol dan mendapat perlakuan perawatan luka menggunakan NaCl 0,9%. Kelompok A1 dan A2 sebagai perlakuan 1 mendapat minyak VCO terozonasi 50,4 mg/ml satu kali per hari, kelompok B1 dan B2 sebagai perlakuan 2 mendapatkan minyak VCO terozonasi 103,2 mg/ml satu kali per hari, kelompok C1 dan C2 sebagai perlakuan 3 mendapat minyak VCO terozonasi 204,0 mg/ml satu kali

per hari. Pemberian minyak VCO terozonasi dilakukan pada hari pertama setelah perlakuan *full thickness skin graft* autolog, kemudian dilakukan observasi selama 12 hari.

Perlakuan proses penyembuhan luka pada tikus yaitu diberikan kompres NaCl 0,9% dan minyak ozon yang dibiarkan terbuka. Sebelumnya, telah dilakukan perlakuan *debridement* pada seluruh kelompok, baik kelompok kontrol dan perlakuan sebelum diberikan



Gambar 3. Penampakan makroskopis luka *full thickness skin graft* masing-masing kelompok (dokumentasi pribadi)

terapi. *Ozonated virgin coconut oil* diaplikasikan pada luka sehari sekali, tipis-tipis menutupi seluruh permukaan luka. Luka dibiarkan terbuka, tidak ditutup apapun. Pengaplikasian *ozonated virgin coconut oil* dilakukan sampai hewan coba mendapatkan perlakuan eksisi.

Pengambilan *skin graft*

Pada akhir hari ke 12 dilakukan anestesi menggunakan ketamine 10% (dosis 50–75 mg/KgBB) intramuskular untuk pengambilan *harvesting* jaringan yang telah dilakukan *full thickness skin graft* autolog diikuti dengan proses terminasi melalui dislokasi vertebra cervical pada tikus yang telah terbius. *Skin graft* direseksi sepanjang 0,5–1 cm dengan jaringan sekitarnya. Fascia (fascia dorsal superficial) dan otot (m. latissimus dorsi) yang terletak di bawah *graft* juga direseksi bersamaan dengan *skin graft*. Sediaan yang direseksi ditransfer ke kotak yang tertutup yang mengandung 10% *neutral buffered* formalin dan fiksasi jaringan 18–24 jam. Agen fiksasi dihilangkan dengan air selama 1 jam. Sediaan dikeringkan dengan mencelupkan jaringan sesaat dengan etanol (70%, 80%, 90%, 100%), dan transfer jaringan yang sudah dikeringkan menjadi dua perubahan xylol selama masing-masing 1 jam. Sediaan yang akan diproses dimasukkan ke lilin parafin panas menyesuaikan lipatan dan kasetnya. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4–5 μm dengan mikrotom dan sediaan diapungkan pada air mandi yang diisi air bersuhu 40°C. Potongan ditransfer ke dalam slide mikroskopik dan dikeringkan

semalaman pada suhu ruangan sampai siap untuk pewarnaan HE dan blok parafin dipersiapkan untuk pengecatan imunohistokimia.

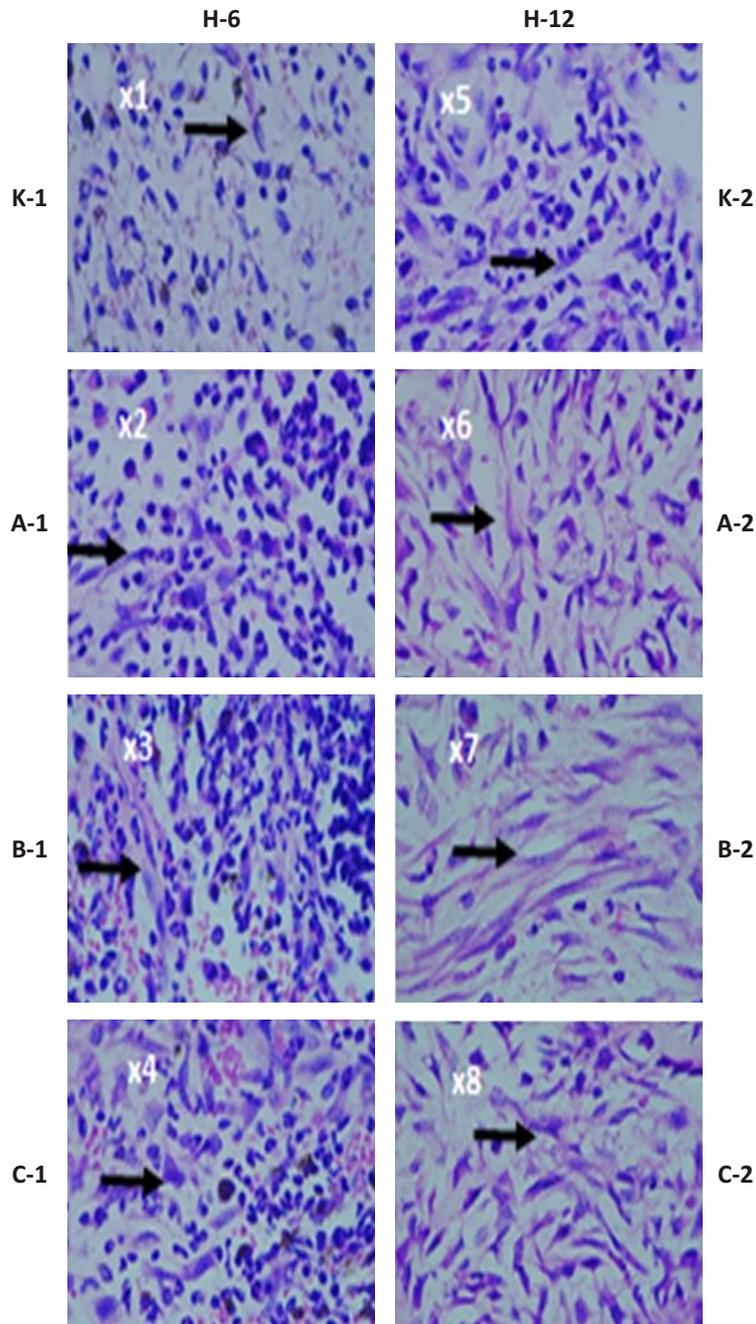
Analisa data

Analisa data dilakukan dengan program SPSS 21.0, meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif variabel terganggu disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik *box plot*. Kemudian dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro-Wilk*. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *One Way Anova* dengan alternatif uji Non Parametrik Kruskal Wallis, dilanjutkan dengan *Post-Hoc Test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%.

HASIL

Pada penelitian ini, selama perlakuan sampai hari ke 12 tidak ada hewan percobaan yang ditemukan mati. Alur penelitian terlihat pada Gambar 2.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian *ozonated virgin coconut oil* dengan berbagai dosis terhadap *full thickness skin graft* menimbulkan efek penyembuhan luka yang secara makroskopis lebih cepat. Secara makroskopis, penyembuhan tepi luka *full thickness skin graft* yang diberikan perawatan luka menggunakan *Ozonated virgin coconut oil* memiliki kerapatan luka yang lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok yang



Gambar 4. Proliferasi *Fibroblast* (Pembesaran 1000x/lpk)

mendapat perawatan NaCl 0,9% pada *full thickness skin graft* (Gambar 3).

Jumlah sel *fibroblast* jaringan melalui pemeriksaan HE pada kelompok K1 dan K2 (tidak mendapat perlakuan), A1 dan A2 (50,4 mg/ml), B1 dan B2 (103,2 mg/ml), C1 dan C2 (204,0 mg/ml) melalui pemeriksaan HE terlihat pada Gambar 4.

Rerata tertinggi hari ke-6 didapatkan pada kelompok C1 diikuti kelompok B1,A1 dan K1. Sedangkan rerata tertinggi pada hari ke 12 didapatkan pada kelompok C2 diikuti kelompok B2,A2 dan K2.

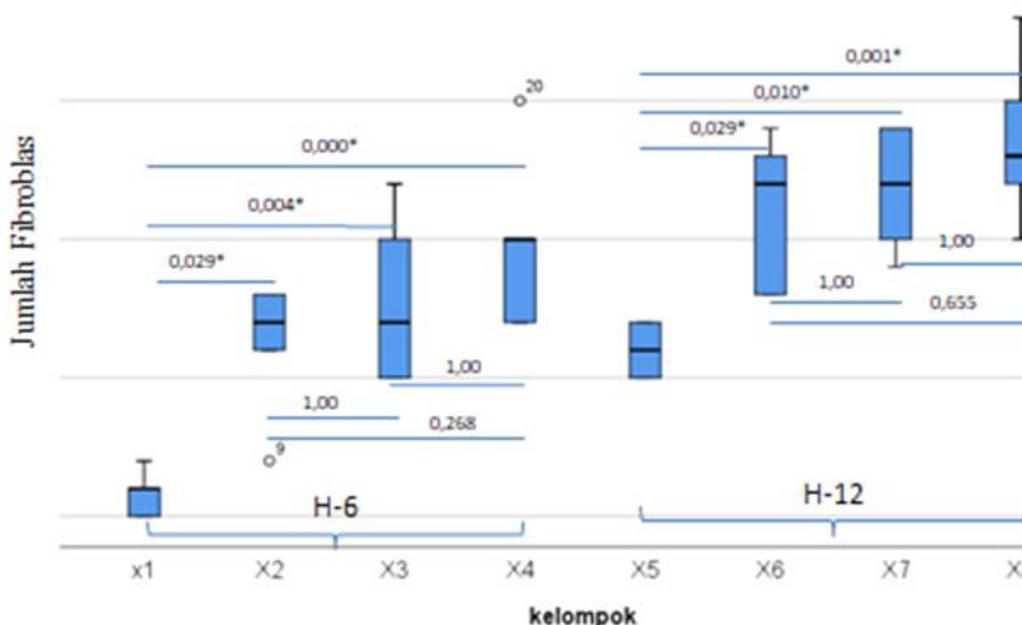
Box plot seperti yang terlihat pada gambar 5 menunjukkan median jumlah proliferasi *fibroblast* pada masing-masing kelompok. Median pada jaringan kelompok K1 dan K2 menunjukkan median yang terendah dibandingkan kelompok lainnya.

Uji normalitas dan homogenitas data dari masing masing kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel kurang dari 50.

Pada kelompok perlakuan hingga hari ke-6 didapatkan distribusi sampel normal ($p > 0,05$) sehingga uji hipotesis dilakukan dengan menggunakan uji *One*

TABEL 1
Karakteristik Data Jumlah Fibroblas

Kelompok	N	Rerata ± SD (%)	Median (%)
Umur	5	5,80 ± 0,837	6,00
Kelas	5	11,20 ± 2,490	12,00
11	5	12,80 ± 3,114	12,00
12	5	14,80 ± 3,271	15,00
TB	5	11,00 ± 1,000	11,00
BB	5	16,00 ± 2,828	17,00
BMI	5	16,80 ± 2,280	17,00
BMI	5	18,60 ± 3,050	18,00



Gambar 5. Grafik box plot data fibroblast

Way ANOVA. Hasil uji *One Way ANOVA* terhadap jumlah fibroblast pada hari ke 6 didapatkan nilai $p = 0,00$. Selanjutnya digunakan uji *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 dengan A1 ($p = 0,029$), K1 dengan B1 ($p = 0,004$), K1 dengan C1 ($p = 0,000$); perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara A1 dengan B1 ($p = 1,00$); A1 dengan C1 ($p = 0,268$); B1 dengan A1 ($p = 1,00$); B1 dengan C1 ($p = 1,00$); C1 dengan A1 ($p = 0,268$); C1 dengan B1 ($p = 1,00$).

Pada akhir hari ke 12 tikus dilakukan terminasi dan diambil jaringan lalu dilakukan pengecatan HE untuk menilai jumlah fibroblast serta dilakukan pengecatan IHC untuk menilai kembali jumlah

ekspresi VEGF. Hasil uji *One Way ANOVA* terhadap jumlah fibroblast pada hari ke 12 didapatkan nilai $p = 0,00$.

Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K2 dengan A2 ($p = 0,029$), K2 dengan B2 ($p = 0,010$), K2 dengan C2 ($p = 0,001$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok A2 dengan B2 ($p = 1,00$), A2 dengan C2 ($p = 0,655$), B2 dengan C2 ($p = 1,00$).

Setelah dilakukan pemeriksaan jumlah proliferasi VEGF pada kelompok K1 dan K2 (tidak mendapat perlakuan), A1 dan A2 (dosis 50,4 mg/ml), B1 dan B2 (dosis 103,2 mg/ml), C1 dan C2 (dosis 204 mg/ml) dengan menghitung jumlah proliferasi VEGF melalui pemeriksaan imunohistokimia didapatkan hasil pada Gambar 6.

TABEL 2

Analisis Post Hoc Bonferroni jumlah fibroblas antar kelompok

Kelompok	A2	B2	C2
K2	0,029*	0,010*	0,001*
A2	–	1,00	0,655
B2	1,00	–	1,00
C2	0,655	1,00	–

*Diuji dengan Post Hoc Bonferroni ($p < 0,05$)

TABEL 3

Karakteristik Data Ekspresi VEGF

Kelompok	N	Rerata \pm SD (%)	Median (%)
K1	5	6,60 \pm 2,608	7,00
A1	5	12,80 \pm 3,114	12,00
B1	5	14,20 \pm 3,421	15,00
C1	5	15,60 \pm 2,408	15,00
K2	5	11,20 \pm 1,304	11,00
A2	5	16,40 \pm 1,817	17,00
B2	5	15,60 \pm 1,817	16,00
C2	5	17,00 \pm 3,317	18,00

TABEL 4

Analisis Post Hoc Bonferroni Ekspresi VEGF antar kelompok

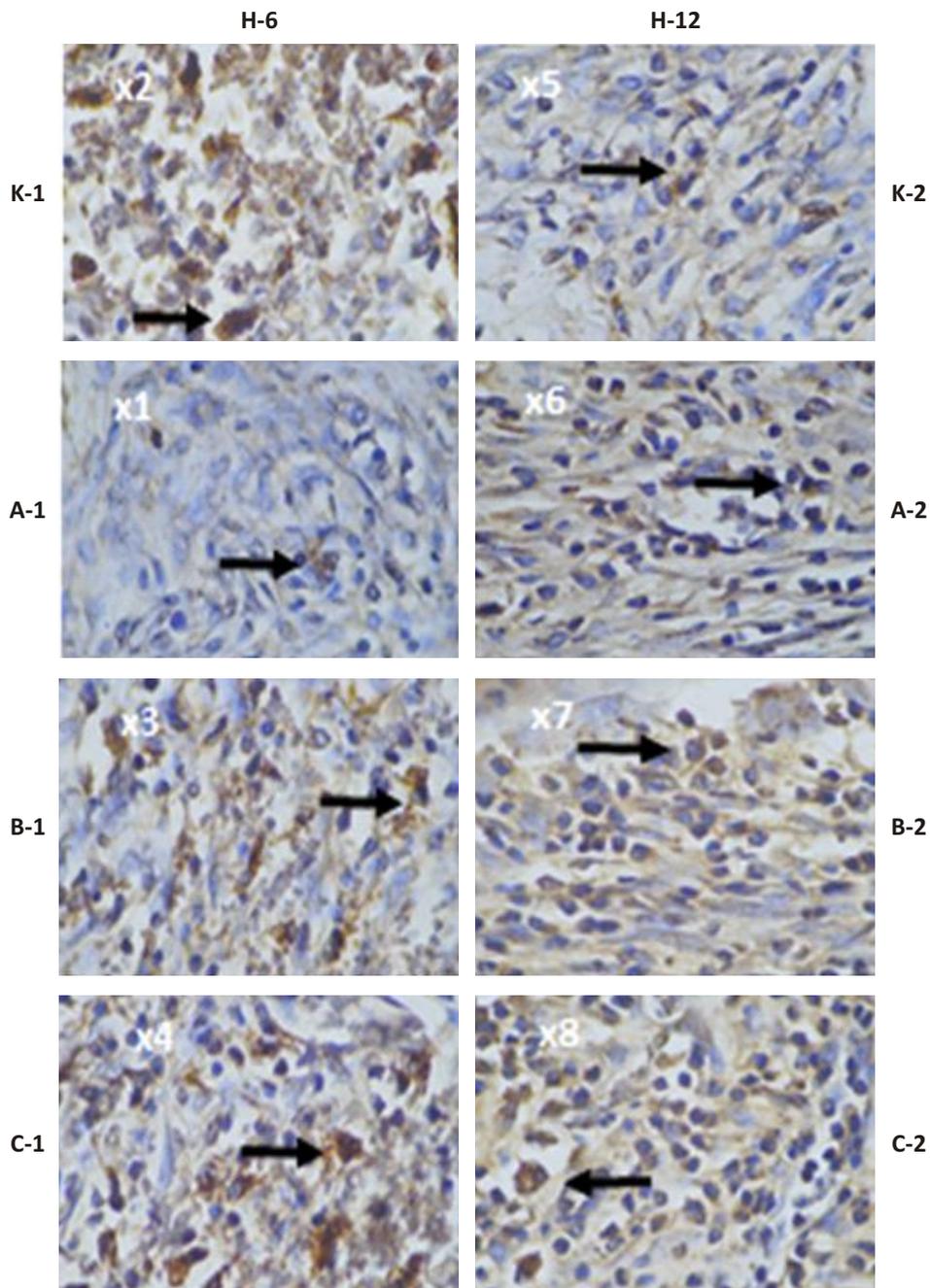
Kelompok	A2	B2	C2
K2	0,011*	0,036*	0,004*
A2	–	1,00	1,00
B2	1,00	–	1,00
C2	1,00	1,00	–

*Diuji dengan Post Hoc Bonferroni ($p < 0,05$)

Tabel 3 menunjukkan rerata jumlah proliferasi VEGF pada kelompok kontrol lebih rendah dibanding pada kelompok yang mendapat perlakuan. Rerata tertinggi hari ke-6 didapatkan pada kelompok C1 diikuti kelompok B1, A1 dan K1. Sedangkan rerata tertinggi pada hari ke 12 didapatkan pada kelompok C2 diikuti kelompok B2, A2 dan K2. *Box plot* seperti yang terlihat pada gambar 7 menunjukkan median jumlah VEGF kelompok K2 lebih rendah dibanding kelompok A2, B2 dan C2.

Uji Normalitas Data Ekspresi VEGF dengan *Saphiro-Wilk* menunjukkan nilai $p > 0,05$ pada masing masing kelompok. Hasil uji *One Way ANOVA* ekspresi VEGF pada hari ke 6 didapatkan nilai $p = 0,00$.

Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 dengan A1 ($p = 0,024$), K1 dengan B1 ($p = 0,005$), K1 dengan C1 ($p = 0,001$); perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara A1 dengan B1 ($p = 1,00$); A1 dengan C1 ($p = 0,890$); B1 dengan A1 ($p = 1,00$); B1 dengan C1 ($p = 1,00$); C1



Gambar 6. Proliferasi VEGF masing-masing kelompok (Pengecatan imunohistokimia dengan pembesaran 1000x/lpk)

dengan A1 ($p = 0,890$); C1 dengan B1 ($p = 1,00$).

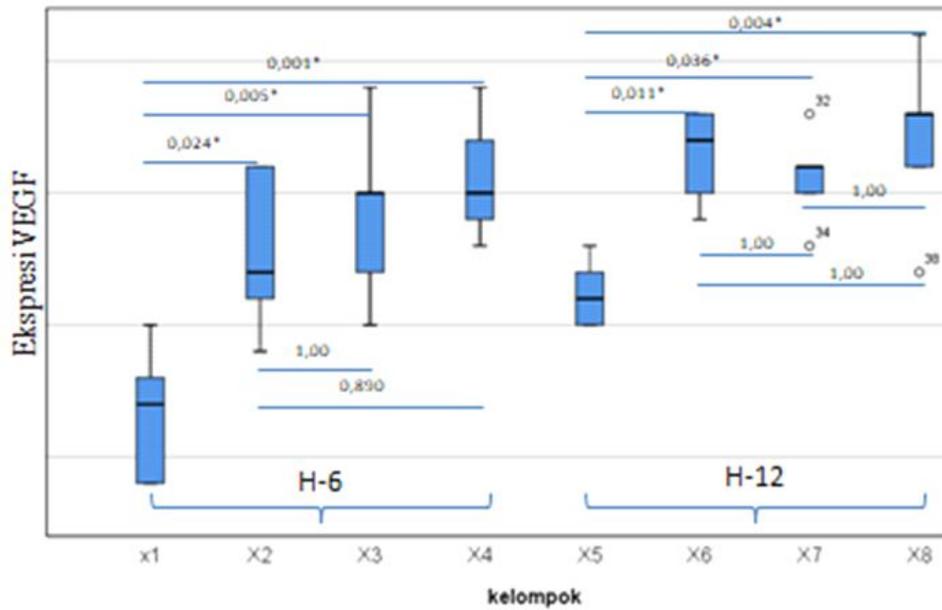
Pada akhir hari ke 12 juga dilakukan penilaian terhadap peningkatan jumlah ekspresi VEGF. Hasil uji *One Way ANOVA* ekspresi VEGF pada hari ke 12 didapatkan nilai $p = 0,00$.

Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna jumlah ekspresi VEGF di akhir hari ke 12 antara kelompok K2 dengan A2 ($p = 0,011$), K2 dengan B2 ($p = 0,036$), serta K2 dengan C2 ($p = 0,04$). Perbedaan yang tidak bermakna didapatkan antara kelompok A2 dengan

B2 ($p = 1,00$), A2 dengan C2 ($p = 1,00$) dan B2 dengan C2 ($p = 1,00$).

DISKUSI

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan bermakna terhadap jumlah proliferasi fibroblast pada hari ke 6 ($p = 0,000$). Selain itu juga terdapat peningkatan bermakna jumlah proliferasi fibroblas pada hari ke 12 ($p = 0,001$). Hal ini menunjukkan bahwa fibroblas akan



Gambar 7. Grafik box plot data ekspresi VEGF

muncul pada awal fase proliferasi dan akan terus meningkat hingga akhir fase proliferasi.

Peningkatan fibroblast yang ditimbulkan oleh ozon sesuai dengan teori yang mendasari bahwa peningkatan *nitric oxide* akan meningkatkan proliferasi dari fibroblas. Ozon diketahui akan menghasilkan produk H₂O₂ dan ROS. ROS yang dihasilkan oleh ozon akan mengaktifasi ekspresi gen *Nitric oxide synthase* sehingga akan meningkatkan pembentukan *nitric oxide*. Pembentukan *nitric oxide* akan merangsang untuk fibroblas berproliferasi.¹¹⁻¹³

Hasil penelitian ini tidak menemukan adanya perbedaan bermakna mengenai jumlah proliferasi fibroblas yang dihasilkan pada berbagai kelompok perlakuan ozon ($p > 0,5$). Hal ini dapat didasari jumlah produk ROS dan NO yang dihasilkan oleh ozon pada tingkatan dosis tidak berbeda.

Analisis perbedaan ekspresi VEGF antar kelompok menggunakan uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara pemberian *ozonated virgin coconut oil* dengan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang membuktikan bahwa pemberian *ozonated virgin coconut oil* akan meningkatkan respon penyembuhan luka yang dibuktikan dengan peningkatan ekspresi VEGF.^{14,15}

Hasil penelitian ini menemukan keberhasilan *graft* dipengaruhi oleh VEGF. Pertumbuhan VEGF baru yang meningkat akan meningkatkan sirkulasi ke *graft site* sehingga *graft* dapat terus vital. Proses pembentukan VEGF terjadi saat fase proliferasi dimulai. Fase proliferasi mulai timbul pada hari 3 hingga hari ke 12. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini proliferasi VEGF yang ditimbulkan sesuai dengan *timeline* fase

penyembuhan luka dimana jumlah VEGF semakin lama semakin meningkat.

Penelitian ini membuktikan bahwa ozon akan meningkatkan jumlah fibroblast, kolagen dan ekspresi VEGF yang merupakan komponen penting dalam proses angiogenesis. Ozon akan berperan untuk memanggil sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-10 untuk menimbulkan kaskade penyembuhan dengan mendorong terstimulasinya VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) dan memastikan suplai fibroblas dapat mencapai tujuan agar bisa menciptakan kolagen untuk perlekatan donor.¹⁰

Peneliti juga menyadari masih banyak keterbatasan penelitian yang harus diperbaiki untuk melengkapi dan menyempurnakan penelitian ini. Salah satu keterbatasan penelitian ini karena diuji hanya pada beberapa mediator inflamasi. Akan lebih baik penelitian mendatang dapat dilakukan pada beberapa mediator inflamasi lain seperti IL-6, IL-10, TNF- α , *Nitric oxide*. Selain itu dipakainya *virgin coconut oil* sebagai bahan pelarut ozon dapat memberikan bias hasil dikarenakan *Virgin coconut oil* juga mempunyai efek antiinflamasi dan mempercepat *wound healing*. Selain itu penelitian ini dilakukan hingga hari ke-12, dimana proses penyembuhan luka masih berlangsung.

SIMPULAN

Pemberian *ozonated virgin coconut oil* topikal efektif dalam meningkatkan proses penyembuhan luka FTSG pada tikus *Sprague Dawley* ditinjau dari perubahan makroskopis luka (luka yang menutup rapat, take yang baik pada luka *skin graft*), peningkatan jumlah proliferasi

fibroblas(di hari ke 6 maupun hari ke 12 dibanding dengan kelompok kontrol), proses penyembuhan luka FTSG ditinjau dari peningkatan ekspresi VEGF(di hari ke 6 maupun ke 12 dibanding dengan kelompok kontrol). Penelitian selanjutnya diharapkan dapat dilakukan pada beberapa mediator inflamasi lain seperti IL 6, IL 10, TNF- α , *nitric oxide*, atau dilakukan penelitian ulang dengan menggunakan bahan pelarut lain selain virgin coconut oil untuk menyingkirkan efek perancu terhadap penyembuhan luka, dan diharapkan penelitian selanjutnya dapat dilakukan hingga akhir penyembuhan luka.

DAFTAR PUSTAKA

- Gosain A, DiPietro L. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004;28(3):321-6.
- 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.
- Klein MB. Thermal, Chemical, and Electrical Injuries. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery.* 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2014; 602-67.
- Sjamsuhidajat, Jong D. *Buku Ajar Ilmu Bedah.* 4 ed. Jakarta: EGC; 2017; 237
- Valacchi G, Lim Y, Belmonte G. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Dipartimento di Scienze Biomediche, Siena.* 2011;19(1):107-1
- Falabella A, Kirsner R. *Wound healing.* Boca Raton : Talyor & Francis; 2005.
- Carmeliet P, Jain R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307.
- Bocci, Velio A. 2005. *Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art.* Archives of Medical Research 37 (2006) 425-435 University of Siena :Siena
- 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
- Valls M, Cronstein B, Montesinos M. Adenosine receptors agonist for promotion of dermal wound healing. *Biochemistry Pharmacology.* 2009;77:1117-24.
- Dua K, Sheshala R, Ling TY, Ling SH, Gorajana A. Anti-Inflammatory, Antibacterial and Analgesic Potential of Cocos Nucifera Linn. : A Review. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2013;12(2):158-64
- Silalahi J, Surbakti C. Burn wound healing activity of hydrolyzed virgin coconut oil. *Int J PharmTech Res.* 2015;8:67-7
- Anggarwal B, Lamba HS, Sharma P, Ajeet. Various Pharmacological Aspects of Cocos ucifera - A Review. *J PharmacolSci.* 2017;5:25-30.
- Johnson K, Wilgus T. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care.* 2014;3(10):77-86.
- Eming SA. *Biology of wound healing.* Surgery. 18: Elsevier; 2018. P. 2413-24.