



*Original Article*

## Efektivitas *Ozonated Virgin Coconut Oil* terhadap Penyembuhan *Full Thickness Skin Defect* pada Tikus *Sprague Dawley*

Herry Maha Putra Surbakti<sup>1</sup>, Renni Yuniati<sup>2</sup>, Djoko Handoyo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Magister Ilmu Biomedik – Konsentrasi Klinik Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>3</sup>Bedah Onkologi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

### Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898  
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v8i2.484>

**Diajukan:** 21 Januari 2021  
**Diterima:** 16 Juni 2021

**Afiliasi Penulis:**  
Magister Ilmu Biomedik – Konsentrasi Klinik Bedah  
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

**Korespondensi Penulis:**  
Herry Maha Putra Surbakti  
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang, Semarang,  
Jawa Tengah 50275,  
Indonesia

**E-mail:**  
herry.surbakti@gmail.com

**Latar belakang :** Luka adalah rusaknya integritas/kontinuitas jaringan yang dapat menimbulkan infeksi. *Virgin coconut oil* (VCO) merupakan produk olahan kelapa yang dibuat pengolahan daging buah kelapa segar pada suhu rendah dan memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Terapi ozon merupakan salah satu terapi alternatif yang memiliki sifat desinfektan dan dapat menginduksi stres oksidatif yang kuat.

**Metode :** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *post test only control group design* pada 60 tikus *Sprague–Dawley* jantan, berat 250±50 gram, aktif, dan tidak memiliki cacat fisik, yang dibagi dalam 10 kelompok. Dibuat luka *full thickness* 1 sentimeter (cm) pada punggung tikus dan diaplikasikan *ozonated VCO* pada luka dengan dosis 3,305mg, 6,61mg, 13,225 mg. Penyusutan ukuran luka diukur dengan jangka sorong dan peningkatan kadar TGF-β pada biopsi jaringan luka tikus diukur dengan pemeriksaan immunohistokimia pada hari ke-7 dan 14. Data dianalisis menggunakan SPSS v.22.0 dengan uji *one way ANOVA*, perbedaan signifikan bila  $p < 0,05$ , dan dilanjutkan dengan uji *post-hoc* Bonferonni untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda ( $p < 0,05$ ).

**Hasil :** Didapatkan peningkatan kadar TGF-β dan penyusutan ukuran luka bermakna pada hari ke-7 dan ke-14 (masing-masing  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ). Kadar TGF-β memiliki perbedaan yang signifikan pada kelompok O1vsO2, O1vsO3, O1vsO4, O1vsO5, O2vsO5, O3vsO5 ( $p = 0,009$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,048$ , berurutan) pada hari ke-7. Pada hari ke-14 didapatkan perbedaan kadar TGF-β signifikan pada kelompok O6vsO8, O6 vsO9, O6vsO10, O7vsO9, O7vsO10, O8vsO10 (masing-masing  $p = 0,011$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,004$ ). Pada hari ke-7 didapatkan perbedaan signifikan penyusutan ukuran luka pada kelompok O1vsO2, O1vsO3, O1vsO4, O1vsO5, O2vsO5, O3vsO4, O3vsO5, O4vsO5 ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,031$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,007$ , berurutan). Perbedaan signifikan penyusutan ukuran luka pada 14 hari didapatkan pada kelompok O6vsO7, O6vsO8, O6vsO9, O6vsO10, O7vsO10, O8vsO10, O9vsO10 (masing-masing  $p = 0,019$ ;  $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,001$ ;  $p = 0,050$ ).

**Simpulan :** Pemberian *ozonated virgin coconut oil* efektif dalam meningkatkan ekspresi TGF-β pada *full thickness defect* tikus *Sprague Dawley* serta efektif dalam meningkatkan penyusutan ukuran luka pada *full thickness defect* tikus *Sprague Dawley*.

**Kata Kunci :** *Ozonated VCO*, full thickness skin defect, TGF-β, penyusutan luka, tikus *Sprague Dawley*

## The Effectiveness of Ozonated Virgin Coconut Oil on Full Thickness Skin Defect Healing in Sprague Dawley Mouse

### Abstract

**Background :** Wound is the damage of tissue integrity/continuity that can lead to infection. Virgin coconut oil is a processed coconut product that is made by coconut meat processing at low temperatures and has a high nutrient content. Ozone therapy is an alternative therapy that has disinfectant properties and can induce strong oxidative stress.

**Methods :** Experimental study post test only control group design on 60 male Sprague-Dawley mice, 250 ± 50 grams, active, and have no physical abnormalities, which were divided into 10 groups. One centimeter of full thickness wound was made on the back of the mice and ozonated VCO was applied to the wound at a dose of 3.305 mg, 6.61 mg, 13.2225 mg. Wound size reduction were measured by caliper and increased levels of TGF-β in mice wound tissue biopsy were measured by immunohistochemical examination on day 7 and 14. Data were analyzed using SPSS v.22.00 with one way ANOVA test, significant difference if  $p < 0.05$ , and continued with Bonferroni's *post-hoc* test to determine which groups were different ( $p < 0.005$ ).

**Results :** There were a significant increase in the TGF-β level and a significant wound size reduction at days 7 and 14 ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ , respectively). There were a significant difference on TGF-β levels in O1vsO2, O1vsO3, O1vsO4, O1vsO5, O2vsO5, O3vsO5 groups ( $p = 0.009$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p = 0.048$ , consecutively) on the 7<sup>th</sup> day. On the 14<sup>th</sup> day, there were significant difference in TGF-β levels in O6vsO8, O6vsO9, O6vsO10, O7vsO9, O7vsO10, O8vsO10 groups (each  $p = 0.011$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.004$ ). On the 7<sup>th</sup> day, there was a significant difference in wound size reduction in O1vsO2, O1vsO3, O1vsO4, O1vsO5, O2vsO5, O3vsO4, O3vsO5, O4vsO5 groups ( $p < 0.001$ ;  $p = 0.031$ ;  $p < 0.001$ ;  $p = 0.007$ , respectively). Significant differences in wound size reduction at 14 days were found in the O6vsO7, O6vsO8, O6vsO9, O6vsO10, O7vsO10, O8vsO10, O9vsO10 groups (each  $p = 0.019$ ;  $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p = 0.001$ ;  $p = 0.050$ ).

**Conclusion :** Administration of ozonated VCO was effective in increasing TGF-β expression in full thickness defect wound of Sprague Dawley mice, and was also effective in increasing the rate of wound size reduction in full thickness defect of Sprague Dawley mice.

**Keywords :** Ozonated VCO, full thickness skin defect, TGF-β, wound size reduction, Sprague Dawley mouse

### PENDAHULUAN

Luka adalah rusaknya atau hilangnya kontinuitas jaringan yang dapat diakibatkan oleh faktor internal seperti obat-obatan, perubahan sirkulasi, perubahan proses metabolisme, infeksi, kegagalan transport oksigen dan juga oleh faktor eksternal seperti suhu yang ekstrim, cedera, alergen, radiasi, zat-zat kimia.<sup>1</sup> Pembagian luka dapat diklasifikasikan berdasarkan struktur sifat anatomi, proses penyembuhan dan lama penyembuhan.<sup>2,3</sup> Tubuh memiliki respon fisiologis terhadap luka, yakni proses penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka terdiri dari berbagai proses yang kompleks untuk mengembalikan integritas jaringan. Selama proses ini terjadi pembekuan darah, respon inflamasi akut dan kronis, neovaskularisasi, apoptosis hingga proliferasi sel. Proses ini dimediasi oleh berbagai sel (platelet, neutrofil, keratinosit, monosit/makrofag neutrofil, fibroblas), sitokin, matriks ekstraselular, dan faktor pertumbuhan seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor beta* (TGF-β), melalui tiga fase proses penyembuhan luka, yaitu fase inflamasi, proliferasi jaringan, dan remodeling.<sup>2</sup>

Penyembuhan luka dimulai saat terjadinya cedera (*injury*), di mana terjadi pembentukan jendalan darah yang bertindak dalam hemostasis dan rekrutmen sel. Sel neutrofil datang pertama kali untuk mencegah infeksi bakteri dan aktivasi keratinosit, fibroblas dan sel imun.

Setelah 2–3 hari, monosit datang dan kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag, yang memfagositosis jaringan nekrotik dan bekerja sama dengan neutrofil dalam mengontrol pertumbuhan bakteri. Fase proliferasi dimulai pada hari ke 2–10 setelah terjadinya cedera, di mana makrofag akan mensekresi *growth factor* seperti TGF-β dan merekrut fibroblas dari tepian lesi luka. Sel-sel tersebut membentuk jaringan granulasi yang berfungsi sebagai substrat migrasi keratinosit, proliferasi dan diferensiasi selama fase re-epitelisasi.<sup>4,5</sup>

*Virgin Coconut Oil* merupakan produk olahan kelapa yang dibuat pengolahan daging buah kelapa segar pada suhu rendah atau tanpa melalui pemanasan dengan tujuan untuk mempertahankan kandungan penting dalam minyak kelapa.<sup>6</sup> Keunggulan VCO dibandingkan minyak kelapa biasa adalah bau kelapa segar, tidak tengik, rasa khas kelapa dan tidak berwarna.<sup>7</sup> *Virgin coconut oil* terbentuk apabila ikatan emulsi yang terdapat pada kelapa dipecahkan.<sup>8</sup> Kandungan utama VCO adalah asam lemak jenuh sekitar 90% dan asam lemak tak jenuh sekitar 10%. VCO memiliki kandungan antioksidan seperti tokoferol dan betakaroten serta sifat *moisturizer* yang menjaga kelembapan kulit serta meningkatkan hidrasi kulit.<sup>9</sup> *Virgin coconut oil* terbukti meningkatkan jaringan granulasi, penurunan bermakna waktu re-epitelisasi, kadar GAG, total protein, heksosa, asam sialic dan elastin pada luka sehingga dapat meningkatkan laju penutupan luka pada luka yang

mengalami *delayed wound healing* serta meningkatkan berbagai petanda luka pada luka *full-thickness wound* pada tikus. Jumlah total kolagen pada luka yang diterapi dengan VCO juga mengalami peningkatan signifikan. Didapatkan pula peningkatan kadar DNA, glikohidrolase, beta glukuronidase dan N-asetil-beta-glukosaminidase pada luka yang diterapi dengan VCO.<sup>10,11</sup>

Terapi ozon merupakan salah satu terapi alternatif yang memiliki sifat desinfektan dan dapat menginduksi stres oksidatif yang kuat, sehingga dapat menstimulasi mekanisme protektif dari sel serta organ, sehingga dengan terapi ini efikasi dari sifat *scavenging* radikal bebas oksigen endogen oleh sel itu sendiri dapat ditingkatkan.<sup>12</sup> Terapi ozon menginaktivasi bakteri dengan merusak selubung sel melalui oksidasi fosfolipid dan lipoprotein, menghambat pertumbuhan jamur, merusak kapsid virus, dan mengganggu siklus reproduksi bakteri.<sup>13</sup> Terapi ozon dapat digunakan sebagai adjuvan ataupun alternatif dari terapi standar pada pasien-pasien dengan berbagai macam jenis perlukaan.<sup>13</sup>

TGF- $\beta$  adalah salah satu *growth factor* yang ditemukan pada proses penyembuhan luka. TGF- $\beta$ 1 memiliki efek respons *fibrotic scarring*, dan TGF- $\beta$ 3 bertanggung jawab terhadap pembentukan *scarless wound healing*. Ketiga isoform dari TGF- $\beta$  tersebut sama-sama berperan aktif dalam penyembuhan luka dan dapat ditemukan pada lesi luka.<sup>14</sup> Kolagen adalah salah satu protein yang terlibat dalam penyembuhan luka. Kolagen dihasilkan oleh fibroblas pada fase proliferasi dan *remodelling* luka, di mana kolagen mempertahankan luka, memungkinkan kulit untuk memiliki sifat *tensile strength*, serta menjadi *framework* serta *scaffolding* pergerakan fibroblas dan sel-sel lainnya dalam proses penyembuhan luka. Kolagen dapat dilihat menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin sebagai zona rangkaian serat berwarna merah muda cerah.<sup>15</sup>

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek pemberian ozon dalam bentuk *ozonated virgin coconut oil* dalam mempercepat waktu penyembuhan luka *full-thickness defect* pada tikus *Sprague Dawley* yang diberi ozon, yang ditinjau dari kadar TGF- $\beta$  dan penyusutan ukuran luka.

## METODE PENELITIAN

### Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-April 2019. Pembuatan *ozonated virgin coconut oil* dilakukan di Center Plasma Research Universitas Diponegoro (Gedung Rektorat). Proses pembuatan model luka *full thickness defect*, perawatan, dan perlakuan terhadap tikus, serta proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Proses pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Hewan Coba, Gedung A

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, pengukuran penyusutan diameter luka dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Gedung A Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, sedangkan pengecatan dan pemeriksaan kadar TGF- $\beta$  dilakukan di Laboratorium Terpadu FK Universitas Gadjah Mada Jogjakarta. Persetujuan penelitian didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

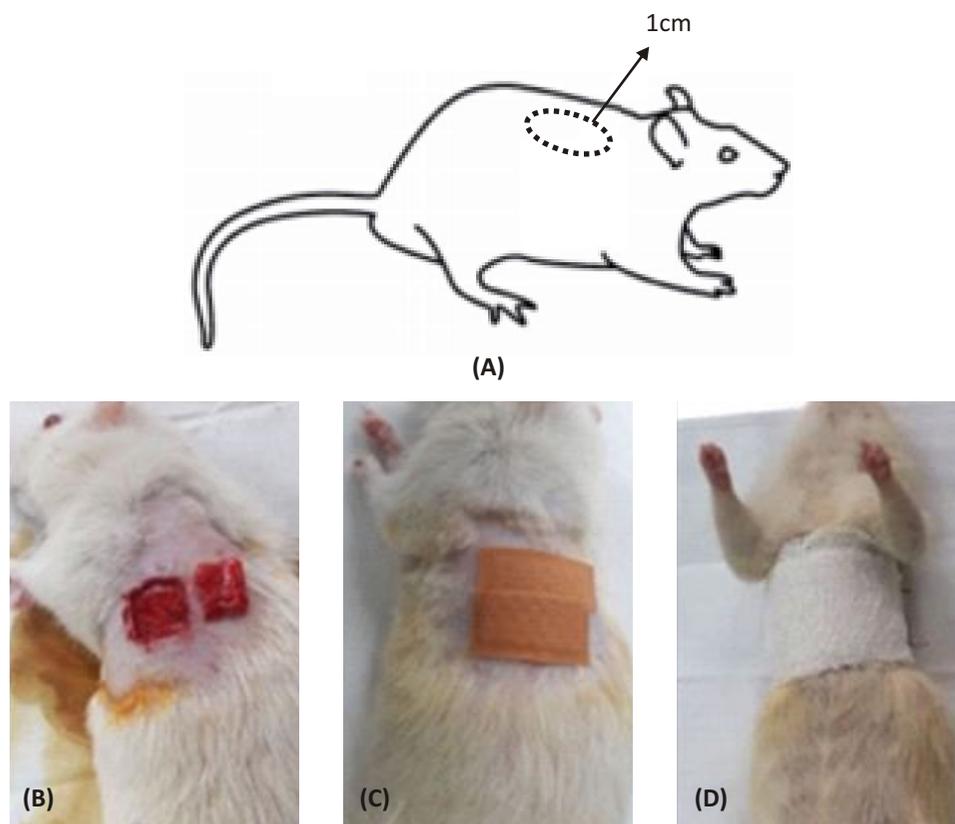
### Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 60 tikus jantan jenis *Sprague Dawley* dewasa dengan berat 250 $\pm$ 50 gram, kondisi sehat (bergerak aktif), dan tidak memiliki abnormalitas yang tampak. Tikus betina, memiliki kecacatan, dan tikus jantan *Sprague Dawley* yang menunjukkan perubahan perilaku (tampak lemah dan malas) dikeluarkan dari penelitian. Dilakukan pembuatan model *full thickness defect* berdiameter 1 cm pada punggung belakang tikus. Prosedur pembuatan *full thickness defect* akan dijelaskan pada bagian berikutnya. Tikus dipelihara dalam suhu ruang 28,0 $\pm$ 2,0°C dengan pencahayaan lampu selama 12 jam, dari pukul 09.00–21.00 dan diberikan makan *ad libitum* (secukupnya). Penelitian ini menggunakan jumlah 6 tikus tiap kelompoknya. Tikus kemudian dieliminasi pada hari ke-7 dan hari ke-14 untuk melihat kadar TGF- $\beta$  dan penyusutan ukuran luka.

### Prosedur Penelitian

*Ozonated ointment* diperoleh dari laboratorium Plasma Research Universitas Diponegoro, yang didapatkan dari pencampuran ozon hasil generator ozon ke dalam minyak. Dilakukan pencampuran ozon dengan minyak menggunakan pengaduk magnetik sehingga didapatkan *ozonated virgin coconut oil* yang siap digunakan sebagai bahan perlakuan. Sampel minyak berozon diambil untuk diuji dengan menggunakan spektrometer (merk, kota asal) atau kit *dissolved ozone meter* (merk, kota asal). Pengukuran kadar ozon dalam minyak berozon diukur dengan metode titrasi kalium iodida.<sup>16,17</sup>

Pembuatan model *full thickness defect* pada tikus dilakukan dengan cara menganestesi tikus dengan campuran Ketamine-Xylazine (dosis ketamine 80 mg/kgBB; dosis Xylazine 10 mg/kgBB) melalui jalur intra-peritoneal, cubit kaki tikus untuk mengecek apakah sedasi sudah bekerja. Tikus kemudian diposisikan *left lateral dekubitus*. Tandai punggung tikus sebagai daerah pembuatan model luka dengan diameter 1 cm, kemudian bersihkan dengan povidone iodine dan dilanjutkan dengan ethanol 70%. Kulit punggung dipotong sampai dasar dari panniculus carnosus. Lokasi insisi dibebaskan dari jaringan lemak dan jaringan pengikat secara lembut, bila perlu dapat diirigasi dengan normal saline. Luka kemudian dibungkus dengan plester hansaplast dengan segmen non adhesif tidak menutupi luka kemudian difiksasi pada bagian dada tikus dengan plester *elastomull*



**Gambar 1.** A. Lokasi pembuatan luka pada punggung tikus. B. Contoh luka pembuatan model *full thickness defect* (pada gambar berbentuk kotak, pada penelitian ini berbentuk bulat). C. Bagian non-adesif dari *Hansaplast* ditempelkan pada model luka yang telah dibuat. D. Plester *Elastomull* digunakan untuk menyelubungi bagian thorax dan dorsum tikus, dan diatur sedemikian rupa kekencangannya agar tikus dapat bernafas dengan baik (pengembangan dada adekuat) serta dapat menggerakkan ekstermitas sebelum dikembalikan ke kandang.

untuk mencegah segmen non adhesif *hansaplast* bergeser. Pemasangan plester elastomull harus diperhatikan agar tidak membuat tikus sulit bergerak, sulit bernapas (pengembangan dada tikus harus tetap adekuat) dan lengan tikus dapat bergerak dengan bebas.

Jurnal pendahulu<sup>18,19</sup> menggunakan variasi *ozonated sesame oil* dengan jumlah 8 mikroliter dengan luka bulat berdiameter 3,5 mm. Dosis yang digunakan adalah 50,6 mg/mL *ozonated virgin coconut oil*, 101,3 mg/mL *ozonated virgin coconut oil*, dan 202,5 mg/mL *ozonated virgin coconut oil*. Dengan demikian, dosis ozon dalam tiap luka berukuran diameter 3,5mm adalah 0,405 mg; 0,81 mg; dan 1,62 mg; secara berurutan.

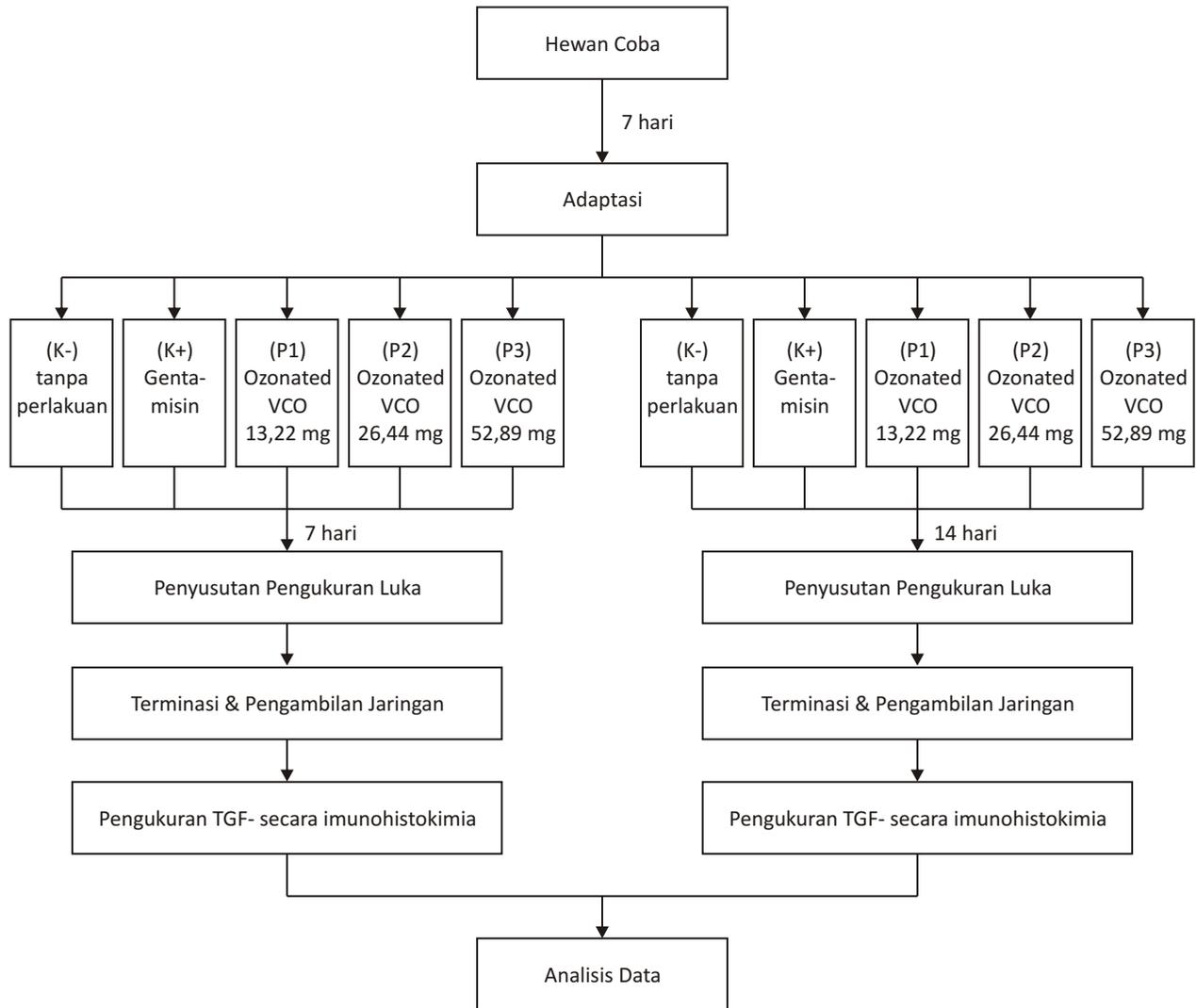
Rumus kapasitas minyak berozon (Cap) ditentukan dengan rumus:

$$Cap = C \times F_{Rate} \times T$$

Di mana C ditetapkan sebagai 45 mg/L,  $F_{Rate}$  ditetapkan sebagai 1,5 liter/menit, dan T 30, 60 dan 120 menit.<sup>18</sup> Volume *ozonated virgin coconut oil* adalah 40 mL.<sup>18</sup> Dengan

demikian, kapasitas ozon per 40 mL *ozonated virgin coconut oil* secara berurutan adalah 2025 mg, 4050 mg dan 8100 mg. Dalam 1 mL *ozonated virgin coconut oil*, kapasitas ozon yang terbentuk secara berurutan adalah 50,6 mg; 101,3 mg; dan 202,5 mg. Jika luas permukaan luka saat ini adalah 314,15 mm<sup>2</sup> (dari hasil  $\pi r^2 = (22/7) \times 5^2$ ), maka dosis ozon yang dibutuhkan adalah  $(78,5714/9,6211) \times$  dosis sebelumnya = 8.166x dosis sebelumnya. Dengan demikian, dosis ozon yang digunakan dalam setiap kelompok pada penelitian ini adalah 3,305 mg, 6,61 mg, dan 13,225 mg ozon.

*Ozonated virgin coconut oil* diaplikasikan pada luka sehari sekali, tipis-tipis menutupi seluruh permukaan luka setiap perlakuan. Pengaplikasian *ozonated ointment* dilakukan sampai hewan coba mendapatkan perlakuan eksisi untuk pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ . Untuk pengukuran penyusutan ukuran luka, setiap kali peneliti akan melakukan pengolesan *ozonated virgin coconut oil*, peneliti terlebih dahulu mengukur diameter luka dengan mikrometer/jangka sorong dengan bantuan mikroskop untuk mengetahui penyusutan luka pada hari ke-7 dan

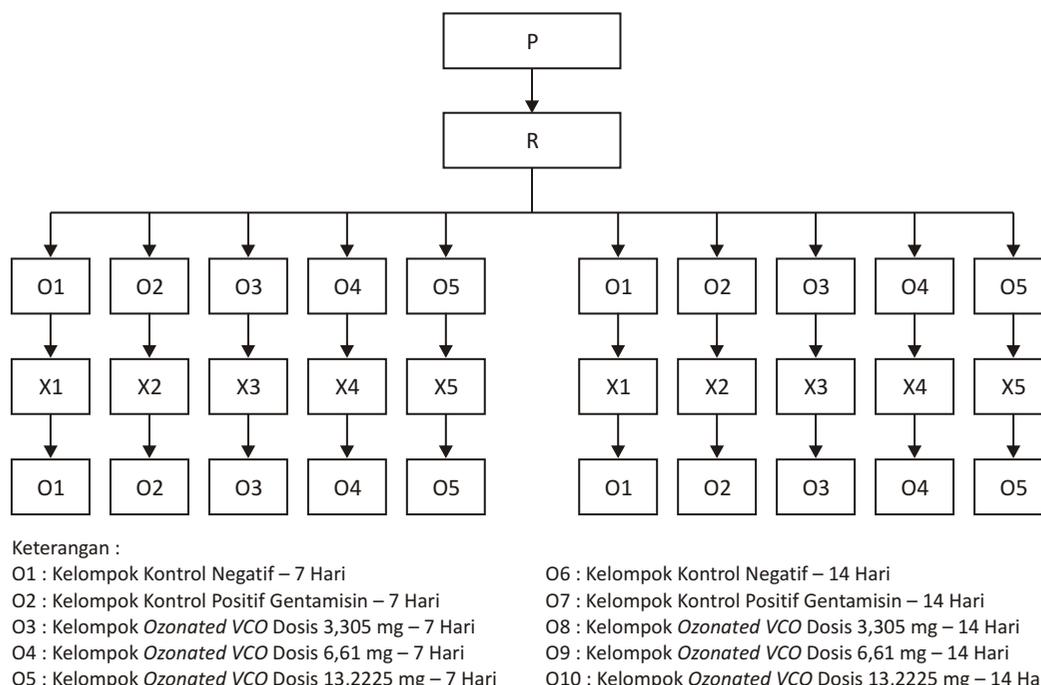


**Gambar 2.** Alur penelitian uji coba ozonated virgin coconut oil pada penyembuhan full thickness skin defect.

ke-14. Kemudian data penyusutan luka akan ditabulasi untuk diolah kemudian. Untuk melakukan pengukuran TGF- $\beta$  secara imunohistokimia, terlebih dahulu tikus harus dikorbankan. Eksisi dilakukan pada hari ke-7 dan hari ke-14 di setiap kelompok dengan mengorbankan 5 hewan coba setiap kali dilakukan eksisi. Pengambilan jaringan luka dilakukan dengan mengorbankan hewan coba menggunakan eter. Setelah efek tercapai, dilakukan eksisi pada bagian luka yang paling luas dengan mengikutsertakan jaringan kulit normal. Jaringan hasil eksisi segera dibentangkan di kertas untuk mempermudah pemotongan dengan *microtome*, kemudian difiksasi dalam *formalin buffer* 10% dan dibuat blok parafin, kemudian dipotong dengan ketebalan 4-6 mikron untuk dilakukan pemeriksaan selanjutnya berupa pemeriksaan ekspresi TGF- $\beta$  pada jaringan hasil biopsi. Jaringan diambil dari luka berukuran 5mm x 5mm x 1 mm pada hari ke 7 dan 14. Setengah dari jaringan

diukur dan dihomogenikan pada 3 ml PHS (pH 7,4) lalu diikuti sentrifugasi yang kemudian disimpan pada freezer -80 C lalu diukur kadar TGF- $\beta$  dengan menggunakan TGF- $\beta$  ELISA kit dan dibaca pada spektrofotometer pada Panjang gelombang 450 nm. Peningkatan kadar TGF- $\beta$  yang dihitung berdasarkan intensitas ekspresi (0=tidak ada ekspresi pada sel; 1=pewarnaan lemah; 2=pewarnaan sedang; 3=pewarnaan kuat) dan persentase sel yang terwarnai (0=tidak ada ekspresi pada sel; 1= <33% ekspresi pada sel; 2= 33-66% ekspresi pada sel; 3= >66% ekspresi pada sel; persentase dihitung pada 100 sel pada daerah *hot spot*). Setiap spesimen akan diekspresikan pada pg/mg dengan rerata  $\pm$  standar deviasi (SD).

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan perhitungan penyusutan ukuran luka dan peningkatan kadar TGF- $\beta$  full thickness defect yang diterapi dengan ozonated virgin coconut oil. Total tikus yang digunakan



**Gambar 3.** Skema *post-test only control group design*.

dalam penelitian ini adalah 60 tikus, yang terbagi menjadi 2 kelompok waktu yaitu terminasi pada waktu 7 hari dan 14 hari paska pembuatan luka dan pemberian terapi *ozonated VCO*. Tidak ada tikus yang *drop out* pada penelitian ini, karena hingga akhir penelitian jumlah tikus dalam tiap kelompok tetap berjumlah 6 tikus.

**Analisis Data**

Analisis Data menggunakan SPSS v.22.0. Normalitas distribusi data diuji dengan uji *Shapiro Wilk* dikarenakan jumlah sampel masing-masing kelompok <50, distribusi data dikatakan normal bila  $p>0,05$ . Apabila distribusi data normal dilanjutkan dengan membandingkan distribusi dari kelompok kontrol dan perlakuan menggunakan uji *one way ANOVA*, hasil dikatakan signifikan bila  $p<0,05$ . Bila didapatkan distribusi data tidak normal maka dilakukan transformasi, apabila setelah transformasi, didapatkan hasil yang tidak homogen; maka data akan diuji beda dengan pengujian non-parametrik metode *Kruskall-Wallis*. Jika didapatkan adanya perbedaan antar kelompok dengan uji beda, uji dilanjutkan pada pengujian *post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana saja yang mengalami perbedaan pada pengujian ini. Untuk menentukan pilihan pengujian *post-hoc*, harus dilakukan uji homogenitas data melalui *Levene Test* terlebih dahulu. Jika didapatkan variansi data yang sama (data homogen), maka uji akan dilanjutkan dengan *post-hoc Bonferonni*; sedangkan jika didapatkan adanya variansi data (data tidak homogen), maka dilakukan dengan uji *post-hoc Games-Howell*.

**HASIL PENELITIAN**

Kadar TGF-β dalam penelitian ini didapatkan melalui pemeriksaan ELISA pada protein penyusun jaringan *full thickness skin defect*. Kadar TGF-β pada hari ke-7 semakin meningkat pada peningkatan dosis *ozonated VCO*. Kadar paling tinggi didapatkan pada *ozonated VCO* 13,2225 mg ( $15,30 \pm 2,22$ ) dan terendah pada kontrol negatif ( $4,00 \pm 2,00$ ). Hasil serupa juga didapatkan pada kelompok periode 14 hari, kadar TGF-β paling tinggi pada *ozonated VCO* 13,2225 mg ( $17,80 \pm 1,92$ ), dan terendah pada kontrol negatif ( $7,20 \pm 1,92$ ).

Data penyusutan ukuran luka dalam penelitian ini didapatkan melalui pengukuran yang dilakukan dengan menggunakan jangka sorong, yang dilakukan pada hari ke-7 dan hari ke-14. Didapatkan hasil ukuran luka yang semakin menyusut dengan peningkatan dosis *ozonated VCO* yang diaplikasikan. Pada hari ke-7 didapatkan ukuran luka paling kecil pada kelompok *ozonated VCO* 13,225 mg ( $4,52 \pm 0,54$  cm) dan paling besar pada kelompok kontrol negatif ( $9,17 \pm 0,39$  cm).

Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang mendapatkan pemberian terapi gentamisin selama tujuh hari, ketiga kelompok pemberian ozon tersebut juga memiliki kadar TGF-β yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, dengan peningkatan bermakna didapatkan pada kelompok yang mendapatkan terapi *ozonated VCO* dengan dosis 13,2225 mg (Tabel 7). Sedangkan, pada periode

TABEL 1  
Rerata  $\pm$  standar deviasi TGF- $\beta$  pada periode 7 hari

Kelompok	TGF- $\beta$ 7 hari Mean $\pm$ SD
Kontrol Negatif – 7 Hari	4,00 $\pm$ 2,00
Kontrol Positif Gentamisin – 7 Hari	8,90 $\pm$ 2,51
Ozonated VCO 3,305 mg – 7 Hari	11,30 $\pm$ 1,75
Ozonated VCO 6,61 mg – 7 Hari	12,20 $\pm$ 1,25
Ozonated VCO 13,2225 mg – 7 Hari	15,30 $\pm$ 2,22

TABEL 3  
Rerata  $\pm$  standar deviasi penyusutan ukuran luka pada periode 7 hari

Kelompok	Penyusutan Ukuran Luka 7 hari Mean $\pm$ SD
Kontrol Negatif – 7 Hari	9,17 $\pm$ 0,39
Kontrol Positif Gentamisin – 7 Hari	6,73 $\pm$ 0,54
Ozonated VCO 3,305 mg – 7 Hari	7,04 $\pm$ 0,63
Ozonated VCO 6,61 mg – 7 Hari	5,89 $\pm$ 0,56
Ozonated VCO 13,2225 mg – 7 Hari	4,52 $\pm$ 0,54

TABEL 5  
Analisis *post-hoc* Bonferonni pada TGF- $\beta$  7 hari

Kelompok	01 <sup>a</sup>	02 <sup>b</sup>	03 <sup>c</sup>	04 <sup>d</sup>	05 <sup>e</sup>
01 <sup>a</sup>	–	0,009*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
02 <sup>b</sup>	0,009*	–	0,717	0,166	0,001*
03 <sup>c</sup>	<0,001*	0,717	–	1,000	0,048*
04 <sup>d</sup>	<0,001*	0,166	1,000	–	0,233
05 <sup>e</sup>	<0,001*	0,001*	0,048*	0,233	–

Keterangan : <sup>a</sup>Kontrol Negatif – 7 Hari, <sup>b</sup>Kontrol Positif Gentamisin – 7 Hari, <sup>c</sup>Ozonated VCO 3,305 mg – 7 Hari, <sup>d</sup>Ozonated VCO 6,61 mg – 7 Hari, <sup>e</sup>Ozonated VCO 13,2225 mg – 7 Hari, \**p* = nilai signifikansi *post-hoc* Bonferonni, signifikan bila <0,05

perlakuan selama 14 hari, peningkatan bermakna telah dapat ditemukan pada terapi ozonated VCO dengan dosis 6,61 mg (Tabel 8). Hasil pengukuran penyusutan ukuran luka memberikan hasil yang serupa dengan TGF- $\beta$ , di mana pada periode perlakuan 7 hari dan 14 hari hanya pemberian terapi ozonated VCO dengan dosis 13,2225 mg memberikan penyusutan luka yang lebih baik secara bermakna dibandingkan dengan

TABEL 2  
Rerata  $\pm$  standar deviasi TGF- $\beta$  pada periode 14 hari

Kelompok	TGF- $\beta$ 14 hari Mean $\pm$ SD
Kontrol Negatif – 14 Hari	7,20 $\pm$ 1,92
Kontrol Positif Gentamisin – 14 Hari	8,20 $\pm$ 1,92
Ozonated VCO 3,305 mg – 14 Hari	12,20 $\pm$ 2,68
Ozonated VCO 6,61 mg – 14 Hari	14,80 $\pm$ 1,78
Ozonated VCO 13,2225 mg – 14 Hari	17,80 $\pm$ 1,92

TABEL 4  
Rerata  $\pm$  standar deviasi penyusutan ukuran luka pada periode 14 hari

Kelompok	Penyusutan Ukuran Luka 14 hari Mean $\pm$ SD
Kontrol Negatif – 14 Hari	6,49 $\pm$ 0,76
Kontrol Positif Gentamisin – 14 Hari	5,36 $\pm$ 0,51
Ozonated VCO 3,305 mg – 14 Hari	4,96 $\pm$ 0,49
Ozonated VCO 6,61 mg – 14 Hari	4,37 $\pm$ 0,28
Ozonated VCO 13,2225 mg – 14 Hari	3,37 $\pm$ 0,31

kontrol positif (Tabel 9 dan 10). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa dosis bertingkat yang dibutuhkan dalam pemberian ozonated VCO untuk mendapatkan penyembuhan luka lebih baik dibandingkan dengan terapi standar menggunakan gentamisin adalah 13,2225 mg, yang dapat memberikan hasil lebih baik dalam hal peningkatan TGF- $\beta$  dan penyusutan ukuran luka dibandingkan dengan terapi standar.

**TABEL 6**  
**Analisis *post-hoc* Bonferonni pada TGF-β 14 hari**

Kelompok	06 <sup>a</sup>	07 <sup>b</sup>	08 <sup>c</sup>	09 <sup>d</sup>	010 <sup>e</sup>
06 <sup>a</sup>	–	1,000	0,011*	<0,001*	<0,001*
07 <sup>b</sup>	1,000	–	0,063	0,001*	<0,001*
08 <sup>c</sup>	0,011*	0,063	–	0,613	0,004*
09 <sup>d</sup>	<0,001*	0,001*	0,613	–	0,332
010 <sup>e</sup>	<0,001*	<0,001*	0,004*	0,332	–

Keterangan : <sup>a</sup>Kontrol Negatif – 14 Hari, <sup>b</sup>Kontrol Positif Gentamisin – 14 Hari, <sup>c</sup>Ozonated VCO 3,305 mg – 14 Hari, <sup>d</sup>Ozonated VCO 6,61 mg – 14 Hari, <sup>e</sup>Ozonated VCO 13,2225 mg – 14 Hari, \**p* = nilai signifikansi *post-hoc* Bonferonni, signifikan bila <0,05

**TABEL 7**  
**Analisis *post-hoc* Bonferonni pada penyusutan ukuran luka 7 hari**

Kelompok	01 <sup>a</sup>	02 <sup>b</sup>	03 <sup>c</sup>	04 <sup>d</sup>	05 <sup>e</sup>
01 <sup>a</sup>	–	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
02 <sup>b</sup>	<0,001*	–	1,000	0,246	<0,001*
03 <sup>c</sup>	<0,001*	1,000	–	0,031*	<0,001*
04 <sup>d</sup>	<0,001*	0,246	0,031*	–	0,007*
05 <sup>e</sup>	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,007*	–

Keterangan : <sup>a</sup>Kontrol Negatif – 7 Hari, <sup>b</sup>Kontrol Positif Gentamisin – 7 Hari, <sup>c</sup>Ozonated VCO 3,305 mg – 7 Hari, <sup>d</sup>Ozonated VCO 6,61 mg – 7 Hari, <sup>e</sup>Ozonated VCO 13,2225 mg – 7 Hari, \**p* = nilai signifikansi *post-hoc* Bonferonni, signifikan bila <0,05

**TABEL 8**  
**Analisis *post-hoc* Bonferonni pada penyusutan ukuran luka 14 hari**

Kelompok	06 <sup>a</sup>	07 <sup>b</sup>	08 <sup>c</sup>	09 <sup>d</sup>	010 <sup>e</sup>
06 <sup>a</sup>	–	0,019*	0,001*	<0,001*	<0,001*
07 <sup>b</sup>	0,019*	–	1,000	0,054	<0,001*
08 <sup>c</sup>	0,001*	1,000	–	0,752	0,001*
09 <sup>d</sup>	<0,001*	0,054	0,752	–	0,050*
010 <sup>e</sup>	<0,001*	<0,001*	0,001*	0,050*	–

Keterangan : <sup>a</sup>Kontrol Negatif – 14 Hari, <sup>b</sup>Kontrol Positif Gentamisin – 14 Hari, <sup>c</sup>Ozonated VCO 3,305 mg – 14 Hari, <sup>d</sup>Ozonated VCO 6,61 mg – 14 Hari, <sup>e</sup>Ozonated VCO 13,2225 mg – 14 Hari, \**p* = nilai signifikansi *post-hoc* Bonferonni, signifikan bila <0,05

### DISKUSI

Pada penelitian ini, seluruh kelompok perlakuan dengan ozon baik selama 7 maupun 14 hari, dengan dosis 3,305 mg, 6,61 mg maupun 13,2225 mg memiliki kadar TGF-Beta yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Pada variabel penyusutan ukuran luka, seluruh

kelompok perlakuan dengan ozon selama 7 dan 14 hari, dengan dosis 3,305 mg, 6,61 mg maupun 13,2225 mg memiliki ukuran luka yang lebih baik secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kedua temuan ini serupa dengan temuan yang didapatkan oleh Kim *et al.* yang menemukan bahwa terdapat peningkatan (*up-regulation*) TGF-β dan peningkatan penyusutan ukuran luka *full-thickness skin wound* pada guinea pig setelah pemberian *ozonated olive oil* dibandingkan dengan

kelompok kontrol.<sup>20</sup> Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ozonated virgin coconut oil meningkatkan ekspresi TGF- $\beta$  dan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif sehingga memiliki potensial untuk meningkatkan proses penyembuhan luka.<sup>20,21</sup>

Penelitian ini menemukan bahwa pemberian ozonated virgin coconut oil dapat meningkatkan keluaran penyembuhan luka kulit akut. Pemberian ozon secara topikal dapat mempengaruhi pembentukan jaringan granulasi dari proses penyembuhan luka, yang ditunjukkan melalui penyusutan ukuran luka yang lebih baik.<sup>20</sup> Peningkatan kadar TGF- $\beta$  yang ditemukan pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa ozon dalam ozonated virgin coconut oil dapat menginduksi ekspresi TGF- $\beta$  dari keratinosit epidermis dan dari fibroblas dermal pada lokasi luka.<sup>20</sup>

Kekurangan dari penelitian ini adalah bahwa kami tidak melakukan uji regresi linier untuk melihat korelasi antara TGF- $\beta$  dan penyusutan ukuran luka. Ke depannya, kami menilai ada perlunya dilakukan penelitian dengan periode yang lebih panjang untuk menilai penyembuhan luka kronis pada pemberian ozon.

## SIMPULAN

Kami menyimpulkan bahwa pemberian ozonated VCO efektif dalam meningkatkan ekspresi TGF- $\beta$  pada luka full thickness defect tikus Sprague Dawley serta efektif dalam meningkatkan penyusutan ukuran luka pada luka full thickness defect tikus Sprague Dawley. Penelitian berikutnya sebaiknya membandingkan efek penggunaan minyak selain VCO sebagai media dari ozon serta melakukan penelitian dengan waktu yang lebih panjang untuk menilai perubahan yang terjadi pada penyembuhan luka kronis dengan pemberian ozon.

## DAFTAR PUSTAKA

- Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings - a review. *BioMedicine*. 2015 Dec;5(4):22.
- Geoffrey C, Victor W. Wound Healing: Normal and Abnormal. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care*. 2014;3(7).
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21.
- Borges GÁ, Elias ST, da Silva SMM, Magalhães PO, Macedo SB, Ribeiro APD, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2017;45(3):364-70.
- Tanasale ML. Aplikasi Starter Ragi Tape terhadap Rendemen dan Mutu Virgin Coconut Oil (VCO). *Ekosains*. 2012;2(1):47-52.
- Fitri R. Formulasi Krim Anti-Aging yang Mengandung Minyak Kelapa Murni (Virgin Coconut Oil). Universitas Sumatera Utara; 2017.
- Cristianti L, Prakosa AH. Pembuatan Minyak Kelapa Murni (Virgin Coconut Oil) menggunakan Fermentasi Ragi Tempe. Universitas Sebelas Maret; 2009.
- Harlinanda SN. Optimasi Formulasi Krim Antioksidan Vitamin E (DL-Alfa Tokoferol Asetat) dengan VCO (Virgin Coconut Oil) (Variasi Kadar VCO 15%, 30%, dan 45% dalam Basis Cold Cream). Universitas Muhammadiyah Malang; 2017.
- Nevin KG, Rajamohan T. Effect of Topical Application of Virgin Coconut Oil on Skin Components and Antioxidant Status during Dermal Wound Healing in Young Rats. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23(6):290-7.
- Soliman AM, Lin TS, Ghafar NA, Das S. Virgin coconut oil and diabetic wound healing: histopathological and biochemical analysis. *Eur J Anat*. 2018;22(2):135-44.
- De Monte A, Gori C. Major ozonated autohaemotherapy in the treatment of limb ulcers not responding to conventional therapy. Vol. 10, *International Journal of Ozone Therapy*. 2011. 85-98 p.
- Degli Agosti I, Ginelli E, Mazzacane B, Peroni G, Bianco S, Guerriero F, et al. Effectiveness of a Short-Term Treatment of Oxygen-Ozone Therapy into Healing in a Posttraumatic Wound. *Case Rep Med*. 2016;2016:1-5.
- Penn JW, Grobelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma*. 2012;2(1):18-28.
- Tanggo VTIP. Pengaruh Pemberian Topikal Ekstrak Kulit Delima Pada Penyembuhan Luka Split Thickness Kulit Tikus. Universitas Airlangga; 2013.
- Rijal S, Nur M. Analisa Pengaruh Ozonisasi Hasil Lucutan Plasma Berpenghalang Dielektrik pada Beras terhadap Perubahan Amilografi, Kekerasan, dan Warna. Vol. 4, *Youngster Physics Journal*. 2015.
- Teke S, Nur M. Produksi Ozon dalam Reaktor Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBDP) Terkait Panjang Reaktor dan Laju Alir Udara. *Berk Fis*. 2014;17(1):25-32.
- Sega A, Zanardi I, Chiasserini L, Gabbrielli A, Bocci V, Travagli V. Properties of sesame oil by detailed 1H and 13C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value, and viscosity measurements. *Chem Phys Lipids*. 2010 Feb;163(2):148-56.
- Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, et al. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen*. 2011 Jan 1;19(1):107-15.
- Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci*. 2009 Jun;24(3):368-74.
- Zhang J, Guan M, Xie C, Luo X, Zhang Q, Xue Y. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.