



Original Article

Efektivitas *Ozonated Virgin Coconut Oil* terhadap Penyembuhan Luka *Full Thickness Skin Graft Autolog* Tikus *Sprague Dawley* Ditinjau dari Ekspresi TGF- β dan Jumlah Neutrofil

Nauval Marta Kusuma¹, Hardian², Najatullah³, Renni Yuniati⁴, Neni Susilaningsih⁵

¹Magister Biomedik dan Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

²Bagian Faal Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

³Bagian Bedah Plastik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

⁴Bagian Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

⁵Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v8i3.489>

Diajukan: 03 Maret 2021
Diterima: 10 September 2021

Afiliasi Penulis:
Magister Biomedik dan Bagian Bedah
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro,
Semarang

Korespondensi Penulis:
Nauval Marta Kusuma
Jalan Dr. Sutomo 16, Jawa Tengah,
Semarang 50244,
Indonesia

E-mail:
emka.nauval@gmail.com

Latar belakang : *Skin graft* saat ini menjadi salah satu terapi pilihan pada proses penyembuhan luka yang selalu berkembang. Ekspresi TGF- β dan jumlah neutrofil memiliki peran penting dalam penyembuhan luka *skin graft*. Ozon (O₃) memiliki sifat desinfektan yang efektif dalam penyembuhan luka. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efektivitas pemberian *Ozonated VCO* terhadap penyembuhan luka *Full Thickness Skin Graft* dilihat dari Ekspresi TGF- β dan jumlah neutrofil.

Metode : Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan *group post-test only design* terhadap 40 ekor tikus *Sprague Dawley* dilakukan *skin graft autologous* pada waktu yang bersamaan. Sampel dibagi secara acak menjadi 8 grup (K1 = tanpa pemberian *Ozonated VCO*), (A1 = *Ozonated VCO* 50 mg/ml), (B1 = *Ozonated VCO* 100 mg/ml), (C1 = *Ozonated VCO* 200 mg/ml) dan (K2 = tanpa pemberian *Ozonated VCO*), (A2 = *Ozonated VCO* 50 mg/ml), (B2 = *Ozonated VCO* 100 mg/ml), (C2 = *Ozonated VCO* 200 mg/ml). Penilaian ekspresi TGF- β dan jumlah neutrofil jaringan dilakukan dengan pengecatan hematoxylin & eosin dan imunohistokimia pada hari ke 6 dan 12 pasca *skin graft*.

Hasil : Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) ekspresi TGF- dan jumlah neutrofil jaringan antara kelompok kontrol dengan pemberian *Ozonated VCO* dosis 50 mg/ml, 100 mg/ml, dan 200 mg/ml pada hari ke 6 dan 12 pasca *skin graft*.

Simpulan : Pemberian *Ozonated VCO* efektif meningkatkan penyembuhan luka *Full Thickness Skin Graft* berdasarkan peningkatan ekspresi TGF- β dan penurunan jumlah neutrofil.

Kata kunci : *Ozonated VCO*, *Full Thickness Skin Graft autologus*, ekspresi TGF- β , jumlah neutrofil.

Autologous Full Thickness Skin Graft Wound Healing on Sprague Dawley Rats Reviewed from TGF- β Expression and Neutrophil Count

Abstract

Introduction : Nowadays, skin graft, as one of therapy choices in wound healing, keeps evolving. Expression of TGF- β and neutrophil count play significant roles in skin graft wound healing. Meanwhile, ozone (O₃) also has disinfectant characteristic which is effective in wound healing. This study was aimed to validate the effectiveness of ozonated VCO to full thickness skin graft wound healing shown by expression of TGF- β and neutrophil count.

Methods : Post-test only experimental study was done to 40 Sprague Dawley mice with autologous skin graft, at the same time. Samples were randomly divided into 8 groups (K1 = without ozonated VCO, A1 = ozonated VCO 50 mg/ml, B1 = ozonated VCO 100 mg/ml, C1 = ozonated VCO 200 mg/ml, K2 = without ozonated VCO, A2 = ozonated VCO 50 mg/ml, B2 = ozonated VCO 100 mg/ml, C2 = ozonated VCO 200 mg/ml). Tissue's expression of TGF- β and neutrophil count were evaluated by immunohistochemistry test and hematoxylin & eosin (HE) staining on day 6 and 12 after skin graft.

Results : Significant differences were shown on tissue's expression of TGF- β and neutrophil count between control group and groups that were administered by ozonated VCO with dosage of 50 mg/ml, 100 mg/ml, and 200 mg/ml on day 6 and 12 after skin graft ($p < 0.5$).

Conclusion : Ozonated VCO was effective in improving full thickness skin graft wound healing, based on increased expression of TGF- β and decreased neutrophil count.

Keywords : Ozonated VCO, full thickness autologous skin graft, expression of TGF- β , neutrophil count.

PENDAHULUAN

Luka didefinisikan sebagai disrupsi/terganggunya kontinuitas lapisan epitel kulit ataupun mukosa yang disebabkan oleh kerusakan fisik dan/atau termal. Luka merupakan salah satu penyebab kematian pada anak-anak di seluruh dunia dan merupakan penyebab pada sekitar 950.000 kematian pada anak-anak dan remaja dibawah 18 tahun pada setiap tahunnya. Penyembuhan dan regenerasi luka adalah proses yang rumit dan terdiri dari tiga fase yaitu fase inflamasi, proliferasi dan *remodeling* jaringan. Penyembuhan luka yang bermasalah sering mengakibatkan kontraksi dan jaringan parut; kontraksi yang berlebihan menyebabkan kontraktur yang dapat menyebabkan komplikasi yang dapat berdampak negatif pada kualitas hidup pasien.¹ Proses penyembuhan luka melibatkan interaksi sitokin, faktor pertumbuhan (*growth factors*), darah dan matriks ekstraseluler. Sitokin akan memicu penyembuhan luka melalui produksi komponen membrana basalis, mencegah terjadinya dehidrasi, meningkatkan inflamasi dan pembentukan dari jaringan granulasi. *Pathway* yang terlibat dalam proses penyembuhan luka dipengaruhi oleh berbagai faktor lokal dan sistemik, salah satunya berupa infeksi.²

Skin graft (tandur kulit) saat ini menjadi salah satu model terapi pilihan penyembuhan luka terutama pada luka yang tidak dapat disembuhkan menggunakan terapi agen topikal dan/atau pembalut luka. *Skin graft* adalah tindakan memindahkan sebagian atau seluruh ketebalan kulit dari satu tempat ke tempat lainnya dan akan terjadi revaskularisasi untuk menjamin kelangsungan hidup kulit yang dipindahkan tersebut.³ Berdasarkan ketebalan eksplan, *skin graft* dibagi menjadi

split-thickness skin graft (STSG) dan full thickness skin graft (FTSG).⁴ Faktor yang berperan dalam penyembuhan luka pada FTSG salah satunya adalah vaskularisasi yang cukup untuk dapat hidup sebelum dan setelah terjalin hubungan erat dengan jaringan resipien. Nutrisi pada *skin graft* dimulai dengan proses sirkulasi plasmatik dimana terjadi proses inhibisi plasma/serum dan oksigen ke dalam *graft*. Oksigen menjadi komponen penting dalam penanganan luka serta keberhasilan *skin graft*.^{3,5}

Virgin coconut oil merupakan produk olahan daging buah kelapa segar pada suhu rendah atau tanpa melalui pemanasan dengan tujuan untuk mempertahankan kandungan penting dalam minyak kelapa.⁶ 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.⁷ VCO 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 glikohidrolase, beta glukuronidase dan N-asetil-beta-glukosaminidase pada luka yang diterapi dengan VCO.^{8,9}

Ozon diklaim sebagai alternatif yang potensial untuk dijadikan agen yang berperan dalam penyembuhan luka pada kulit selain terapi konvensional yang sudah ada.⁶ Interaksi ozon terhadap jaringan kulit

menyebabkan inaktivasi bakteri, virus dan jamur, menstimulasi produksi antioksidan, mengurangi viskositas darah dan plasma, meningkatkan *erythrocyte membrane fluidity*, pelonggaran jaringan, merangsang aktivitas hemoglobin dan meningkatkan penyerapan sekaligus pelepasan oksigen, memperbaiki sirkulasi darah ke jaringan, menginduksi pembentukan jaringan kolagen, aktivasi jaringan granulasi, dan mempercepat epitelisasi (pertumbuhan sel kulit), serta peningkatan aktivitas fagositosis, dan aktivasi fibroblas.¹⁰

Pembentukan minyak ozon, diperoleh dengan membuat ozon dalam bentuk gas menjadi minyak dengan cara *cold-press* seperti minyak zaitun, minyak bunga matahari dan banyak asam lemak tak jenuh lainnya. Keuntungannya adalah umur simpan 2 tahun jika disimpan dalam lemari es berbeda dengan *ozonated water* yang memiliki waktu paruh 20 menit dengan suhu air 20°C dan meningkat dengan peningkatan suhu air.¹¹

TGF- β berfungsi kemotaksis dari fibroblas dan otot polos, dan memodulasi pembentukan kolagen dan kolagenase. Proses ini secara keseluruhan akan menyebabkan deposisi jaringan ikat baru kedalam lokasi luka yang dikenal sebagai fase proliferasi, dan setelah semua proses epithelialisasi, granulasi, dan neovaskularisasi selesai, akan diikuti oleh suatu proses *remodelling* untuk mengembalikan struktur yang baru terbentuk mendekati kondisi awalnya.¹²

Full thickness skin graft menjadi pilihan untuk menutup luka karena hasil yang baik. Namun perlu penelitian lebih lanjut mengenai proses penyembuhan luka pada FTSG untuk mengurangi penerimaan jaringan yang tidak merata atau tidak teratur yang mengakibatkan kontraktur berulang dan perbedaan pigmen. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek pemberian ozon topikal dalam bentuk *ozonated VCO* pada penyembuhan luka FTSG autolog tikus *Sprague Dawley*, yang ditinjau dari kadar TGF- β dan jumlah neutrofil.

METODE

Design, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental melibatkan dua grup kontrol dan enam grup intervensi dengan *group post-test only design* dilaksanakan periode Mei-Juni 2019. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan No. 54/EC/H/KEPK/FK-UNDIP/V/2019. Pembuatan *ozonated VCO* dilakukan di *Center Plasma for Research* Universitas Diponegoro, Semarang. Proses pembuatan luka dan penerapan FTSG autologus, serta proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Hewan Universitas Brawijaya, Malang. Proses pembuatan preparat, pewarnaan HE serta pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi

Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Sampel penelitian

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor tikus dengan cadangan 10%. Digunakan 48 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan, umur 2-3 bulan, kondisi sehat (bergerak aktif), dengan berat 250±50 gram, tidak ada abnormalitas yang tampak. Tikus dibagi secara acak menjadi 8 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Tikus dengan kecacatan dan menunjukkan perubahan perilaku selama aklimatisasi (tampak sakit dan tidak aktif) dikeluarkan dari penelitian.

Prosedur Penelitian

Ozon diperoleh dari laboratorium *Plasma Research* Universitas Diponegoro, yang didapatkan dari hasil generator ozon. Ozon yang dihasilkan akan dicampurkan ke dalam VCO. Pengaduk magnetis digunakan untuk memudahkan pencampuran ozon dengan VCO yang akan dijadikan bahan aktif pada *ozonated VCO*. *Ozone* dicampurkan ke dalam 100 cc VCO dengan aliran oksigen sebesar 0,1 L/menit dan konsentrasi ozon 3360 ppm. Pengukuran kadar ozon dalam *ozonated VCO* diukur dengan metode titrasi kalium iodida

Penelitian dilakukan dengan membuat model *full thickness skin graft* pada tikus. Pertama-tama dilakukan pengambilan area kulit sehat untuk *skin graft*. Setelah itu, dilakukan pemotongan jaringan lemak dan jaringan ikat yang berada dibawah *skin graft*. Setelah itu, dapat dilakukan penutupan *skin graft* pada area kulit yang lesi dengan dilakukan penjahitan *skin graft* secara interruptus pada tengah *skin graft*, keempat sudut *graft* dan dua jahitan pada masing-masing sisi *graft* dengan benang *T-lene 5.0*.

Setelah dilakukan FTSG, luka pada tikus dibersihkan dengan *normal saline* dan diberi perlakuan sesuai kelompok. Kelompok kontrol diberikan perlakuan penutupan luka dengan kassa lembab NaCl 0,9% selama 6 (K1) dan 12 (K2) hari. Kelompok perlakuan 1 (A) dioleskan *ozonated VCO* 50 mg/ml 1x sehari selama 6 (A1) dan 12 (A2) hari. Kelompok perlakuan 2 dioleskan *ozonated VCO* 100 mg/ml 1x sehari selama 6 (B1) dan 12 hari (B2). Kelompok perlakuan 3 (C) dioleskan *ozonated VCO* 200 mg/ml 1x sehari selama 6 (C1) dan 12 (C2) hari.

Euthanasia dilakukan pada tikus dengan bantuan Ketamine-Xylazine diikuti dengan dislokasi cervical. Pada tahapan ini, dilakukan penilaian ukuran *graft*, perlekatan jaringan, kontraktur, tanda-tanda infeksi akan dinilai. *Skin graft* direseksi sepanjang 0,5-1 cm dengan jaringan sekitarnya. Fascia (fascia dorsal superfisial) dan otot (*latissimus dorsi*) yang terletak dibawah *graft* juga direseksi bersamaan dengan *skin graft*. Sediaan kemudian dibuat preparat histologisnya dan diberi pewarnaan HE

kemudian dinilai dengan mikroskop cahaya. Penilaian dilakukan dengan metode rerata neutrofil pada jaringan *skin graft* dalam 4 lapangan pandang perbesaran 1000 x dan pengukuran rerata persentase ekspresi TGF- β terhadap *skin graft* dengan pewaranaan immunohistokimia.

Analisis

Analisis data hasil penelitian diolah dengan *software SPSS 25.0 for Windows*. Data yang diperoleh dari pengamatan penelitian berupa ekspresi TGF- β dan jumlah neutrofil dianalisis secara deskriptif dan dipresentasikan dalam bentuk tabel. Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Data yang terdistribusi normal kemudian akan dilakukan uji hipotesis menggunakan uji *One-Way ANOVA* diikuti dengan uji *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

HASIL

Kondisi Graft

Setelah dilakukan perlakuan *full thicknes skin graft*, dilakukan pengamatan perlakuan terhadap *graft* secara makroskopis pada hari ke-1, 6, dan 12.

Secara makroskopis, dilakukan pengamatan ukuran *graft*, perlekatan jaringan, kontraktur, tanda-tanda infeksi pada FTSG dari setiap kelompok. Pemberian *ozonated VCO* dengan berbagai dosis terhadap FTSG menimbulkan efek penyembuhan luka yang secara

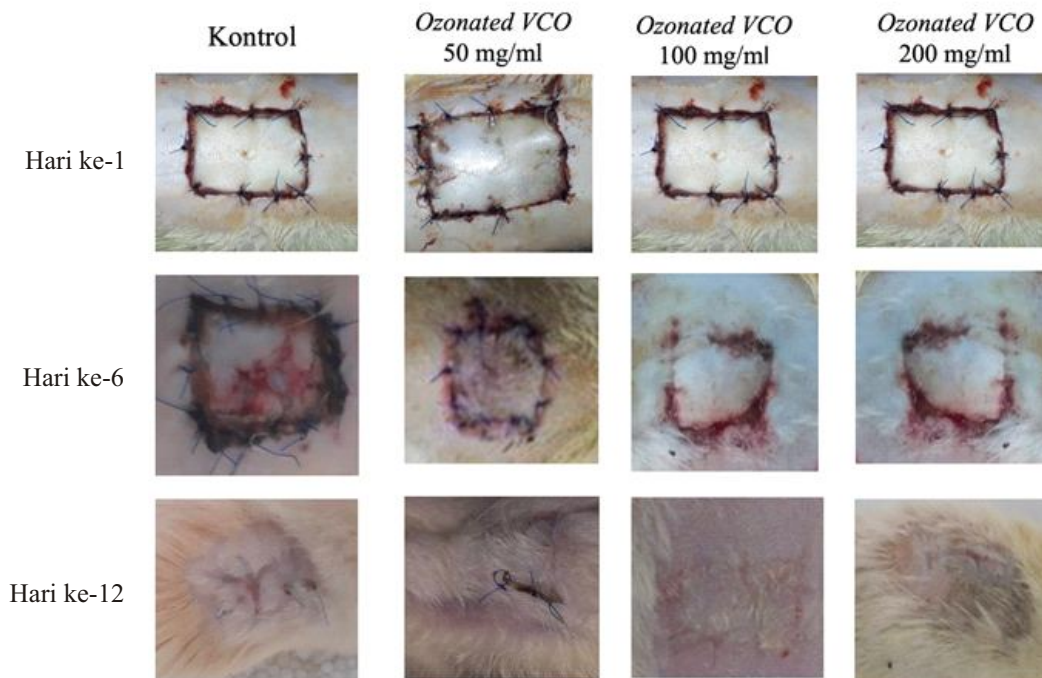
makroskopis lebih cepat. Secara makroskopis, penyembuhan tepi luka FTSG yang diberikan perawatan luka menggunakan *ozonated VCO* memiliki kerapatan luka yang lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok yang mendapat perawatan NaCl 0,9% pada FTSG. Proses penyembuhan luka dan kerapatan luka pada pemberian *ozonated VCO* menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan kelompok kontrol.

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)

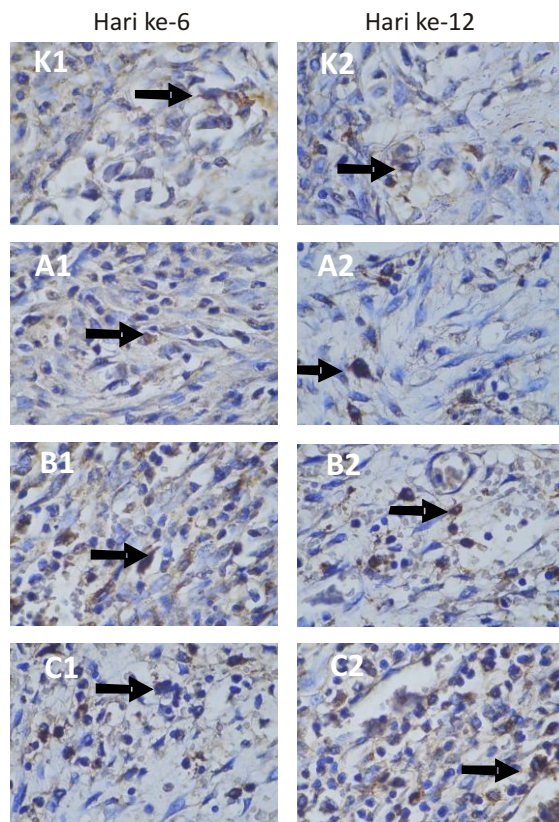
Setelah dilakukan pengambilan jaringan, dilakukan pengecatan immunohistokimia. Pembacaan preparat jaringan dengan pengecatan immunohistokimia dilakukan oleh ahli patologi pada setiap kelompok dengan *single blind*. Data yang didapatkan dilakukan perhitungan rerata presentase TGF- β terhadap *skin graft*.

Terdapat peningkatan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan (A1, B1, dan C1) terhadap kelompok kontrol (K1) pada hari ke-6. Terdapat peningkatan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan (A2, B2, dan C2) terhadap kelompok kontrol (K2) pada hari ke-12.

Tabel 1 menunjukkan rerata persentase ekspresi TGF- β pada jaringan FTSG. Data tersebut menunjukkan rerata ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol lebih rendah dibanding pada kelompok yang mendapat perlakuan. Rerata tertinggi hari ke - 6 dan 12 didapatkan pada kelompok C. *Median* pada kelompok K menunjukkan *median* terendah dibandingkan kelompok lainnya.



Gambar 1. Makroskopis Efek *Ozonated VCO* pada FTSG



Gambar 2. Ekspresi TGF- β (Pewarnaan IHC dengan pembesaran 1000x)

TABEL 1
Karakteristik data ekspresi TGF- β

Kelompok	Hari ke - 6		Hari ke - 12	
	Rerata \pm SD (%)	Median (%)	Rerata \pm SD (%)	Median (%)
K (kontrol)	8,20 \pm 1,30	8,00	9,20 \pm 1,30	9,00
A (dosis 50 mg/ml)	10,40 \pm 1,34	11,00	14,40 \pm 1,94	15,00
B (dosis 100 mg/ml)	13,80 \pm 2,86	14,00	16,40 \pm 2,07	17,00
C (dosis 200 mg/ml)	17,00 \pm 2,91	18,00	18,40 \pm 4,39	20,00

Uji normalitas dan homogenitas data dari masing-masing kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel kurang dari 50. Uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai $p > 0,05$ pada masing-masing kelompok sehingga dapat disimpulkan distribusi data ekspresi TGF- β terdistribusi normal dan homogen pada semua kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *One-Way ANOVA* untuk menguji hipotesis, yaitu adakah perbedaan bermakna antara lamanya perlakuan hari ke-6 dengan hari ke-12 terhadap ekspresi TGF- β .

Hasil uji *One-Way ANOVA* pada kelompok perlakuan hingga hari ke-6 didapatkan nilai $p = 0,001$; karena $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan.

Selanjutnya digunakan uji *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 dengan B1 ($p = 0,023$); dan K1 dengan C1 ($p = 0,000$).

Hasil uji *One-Way ANOVA* pada kelompok perlakuan hingga hari ke-12 didapatkan nilai $p = 0,001$, karena $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan. Selanjutnya digunakan uji *Post Hoc Bonferroni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji *Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K2 dengan A2 ($p = 0,042$); K2 dengan B2 ($p = 0,002$); dan K2 dengan C2 ($p = 0,000$).

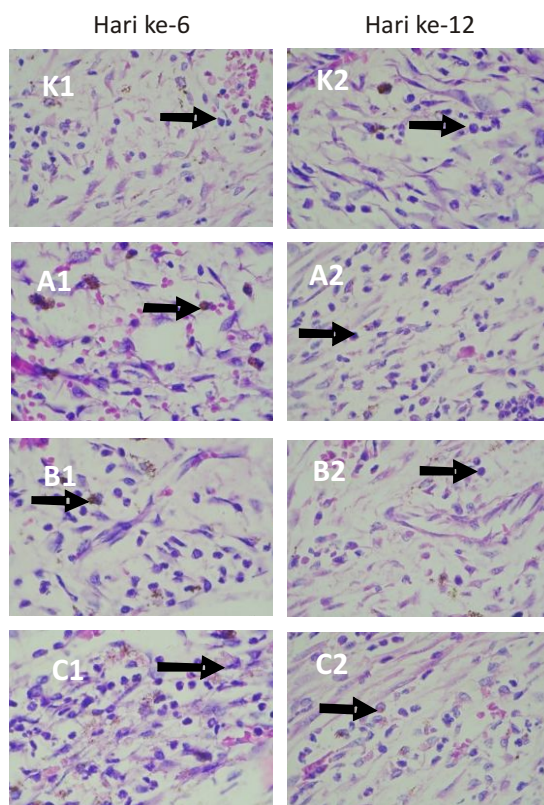
Hasil penelitian menunjukkan ekspresi TGF-β yang ditimbulkan sebagai efek perawatan luka dengan *Ozonated VCO* memiliki rerata lebih tinggi daripada kelompok kontrol yang mendapat perawatan NaCl 0,9% terhadap luka FTSG. Kelompok yang dilakukan pemberian *Ozonated VCO* dosis 50 mg/ml; 100 mg/ml dan 200 mg/ml menunjukkan ekspresi TGF-β yang lebih tinggi baik pada kelompok hari ke-6 maupun hari ke-12. Pada penelitian ini didapatkan rerata ekspresi TGF-β kelompok hari ke-12 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok hari ke-6 dengan rerata tertinggi pada hari ke-12 terdapat pada kelompok perlakuan *ozonated VCO* dengan dosis 200 mg/ml ($18,40 \pm 4,39$) dan pada kelompok hari ke-6 rerata ekspresi TGF-β tertinggi juga terdapat pada kelompok perlakuan *ozonated VCO* dosis

200 mg/ml ($17,00 \pm 2,91$). Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan bermakna terhadap ekspresi TGF-β pada hari ke-6 ($p=0,001$) dan ke-12 ($p=0,001$). Hasil ini menunjukkan bahwa TGF-β akan muncul pada awal fase inflamasi dan akan terus meningkat hingga akhir fase proliferasi.

Neutrofil

Jumlah neutrofil didapatkan dari pemeriksaan terhadap jaringan yang telah dicat dengan HE dibawah mikroskop dengan menghitung rerata jumlah neutrofil yang ada di 4 lapangan pandang untuk masing-masing sampel penelitian.

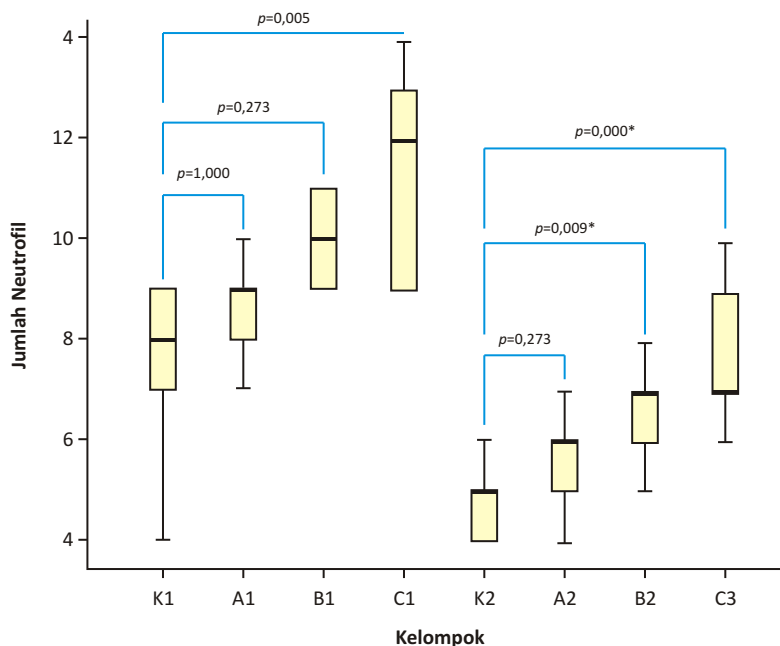
Presentase jumlah neutrofiil pada kelompok kontrol (K1) lebih rendah dibandingkan kelompok



Gambar 3. Jumlah Neutrofil (Pewarnaan HE dengan pembesaran 1000x)

TABEL 2
Karakteristik Data Jumlah Neutrofil

Kelompok	Hari ke – 6		Hari ke – 12	
	Rerata ± SD (%)	Median (%)	Rerata ± SD (%)	Median (%)
K (kontrol)	7,40 ± 2,07	8,00	4,60 ± 0,83	5,00
A (dosis 50 mg/ml)	8,60 ± 1,14	9,00	5,60 ± 1,14	6,00
B (dosis 100 mg/ml)	10,00 ± 1,00	10,00	6,60 ± 1,14	7,00
C (dosis 200 mg/ml)	11,40 ± 2,30	12,00	7,80 ± 1,64	7,00



Gambar 4. Grafik box plot data jumlah neutrofil

perlakuan (A1, B1, dan C1) pada hari ke-6. Persentase jumlah neutrofil pada kelompok kontrol (K2) lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan (A2, B2, dan C2) pada hari ke-12.

Tabel 2 menunjukkan rerata prosentase jumlah neutrofil pada jaringan FTSG. Dari data tersebut menunjukkan rerata jumlah neutrofil pada kelompok kontrol lebih rendah dibanding pada kelompok yang mendapat perlakuan. Rerata tertinggi hari ke-6 dan 12 didapatkan pada kelompok C.

Box plot seperti yang terlihat pada gambar 4 menunjukkan sebaran median jumlah neutrofil pada masing-masing kelompok. Median pada kelompok K2 menunjukkan median terendah dibandingkan kelompok lainnya.

Uji normalitas dan homogenitas data dari masing-masing kelompok dilakukan dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk karena sampel kurang dari 50. Uji Shapiro-Wilk menunjukkan nilai $p > 0,05$ pada masing-masing kelompok sehingga dapat disimpulkan distribusi data jumlah neutrofil terdistribusi normal dan homogen pada semua kelompok. Selanjutnya dilakukan uji One-Way ANOVA untuk menguji hipotesis, yaitu adakah perbedaan bermakna antara lamanya perlakuan hari ke-6 dengan hari ke-12 terhadap jumlah neutrofil.

Hasil uji One-Way ANOVA pada kelompok perlakuan hingga hari ke-6 didapatkan nilai $p=0,001$, karena $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan. Selanjutnya digunakan uji Post Hoc Bonferroni untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji Post Hoc Bonferroni didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K1 dengan C1 ($p=0,005$).

Hasil uji One-Way ANOVA pada kelompok perlakuan hingga hari ke-12 didapatkan nilai $p=0,001$, karena $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan. Selanjutnya digunakan uji Post Hoc Bonferroni untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji Post Hoc Bonferroni didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K2 dengan B2 ($p=0,009$); dan K2 dengan C2 ($p=0,000$).

Hasil penelitian menunjukkan jumlah neutrofil yang ditimbulkan sebagai efek perawatan luka dengan ozonated VCO memiliki rerata lebih tinggi daripada kelompok kontrol yang mendapat perawatan NaCl 0,9% terhadap luka FTSG. Kelompok yang dilakukan pemberian ozonated VCO dosis 50 mg/ml; 100 mg/ml dan 200 mg/ml menunjukkan jumlah yang lebih tinggi baik pada kelompok hari ke-6 maupun hari ke-12. Pada penelitian ini didapatkan rerata jumlah neutrofil kelompok hari ke-12 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok hari ke-6 dengan rerata tertinggi pada hari ke-6 terdapat pada kelompok perlakuan ozonated VCO dengan dosis 200 mg/ml ($11,40 \pm 2,30$) dan pada kelompok hari ke-12 rerata jumlah neutrofil tertinggi juga terdapat pada kelompok perlakuan ozonated VCO dosis 200 mg/ml ($7,80 \pm 1,64$).

PEMBAHASAN

Efek ozonated VCO Dosis Bertingkat terhadap Makroskopis Full Thickness Skin Graft (FTSG)

Proses FTSG berjalan dengan lancar tanpa kendala berarti dan dilakukan dalam satu waktu bersamaan sehingga meminimalisir bias. Pemberian ozonated VCO

dengan berbagai dosis terhadap FTSG menimbulkan efek penyembuhan luka yang secara makroskopis lebih cepat. Secara makroskopis, penyembuhan tepi luka FTSG yang diberikan perawatan luka menggunakan *ozonated VCO* memiliki kerapatan luka yang lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok yang mendapat perawatan NaCl 0,9% pada FTSG.

Takegraft sangat dipengaruhi dari sirkulasi darah yang adekuat dan transport oksigen yang cukup. Putusnya pembuluh darah saat perlakuan FTSG akan membuat graft donor berisiko menjadi daerah iskemik.¹³ Pada penelitian ini didapatkan *graft* tetap vital dan tumbuh dengan baik. *Take FTSG* yang diberi perlakuan *ozonated VCO* menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang membuktikan bahwa *ozonated VCO* dapat meningkatkan sirkulasi darah dan *transport* oksigen ke jaringan iskemik.¹⁴

Efek *Ozonated VCO* Dosis Bertingkat pada Kadar TGF- β

Peningkatan ekspresi TGF- β yang ditimbulkan oleh ozon sesuai dengan teori yang mendasari bahwa ozon meningkatkan *growth factor* secara endogen sehingga menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah. Kadar TGF- β ditemukan lebih tinggi pada tepi lesi yang sedang mengalami proses re-epitelialisasi dan *remodeling*.¹⁵⁻¹⁷ Hal ini ditemukan pula pada ukuran luka, dimana didapatkan adanya penurunan ukuran luka yang signifikan pada tikus dengan terapi ozon dibandingkan dengan terapi standar.

Efek *Ozonated VCO* Dosis Bertingkat pada Jumlah Neutrofil

Jumlah neutrofil jaringan akan mengalami peningkatan pesat pada fase inflamasi dan mengalami penurunan pada akhir fase inflamasi karena proses apoptosis dan fagositosis. Setelah fase inflamasi, proses penyembuhan luka akan berlanjut ke fase proliferasi, dimana jumlah neutrofil jaringan sudah mengalami penurunan pesat. Jumlah neutrofil yang berlebihan akan memperpanjang fase inflamasi yang dapat memperpanjang waktu penyembuhan luka dan menimbulkan komplikasi.^{17,18}

Pemeriksaan pada hari ke-6 menunjukkan adanya jumlah neutrofil yang tidak terlalu tinggi dan menurun pada hari ke-12. Hal ini mengindikasikan bahwa pada hari ke-6 proses penyembuhan luka sudah mulai memasuki awal proliferasi, dimana jumlah neutrofil mulai menurun karena sebagian besar neutrofil telah mengalami apoptosis dan difagosit oleh makrofag.

Turunnya jumlah neutrofil mengindikasikan selesainya fase inflamasi dan dimulainya fase proliferasi.¹⁹ *Ozonated VCO* dosis 200 mg/ml terbukti efektif menekan jumlah neutrofil paling banyak dibandingkan kelompok *ozonated VCO* dosis 50 mg/ml; 200 mg/ml; dan kelompok kontrol bila dilihat di hari

ke-6. Segera setelah jumlah neutrofil turun maka proses penyembuhan luka memasuki fase proliferasi. Semakin sedikit jumlah neutrofil jaringan, semakin cepat jaringan mengalami proliferasi dan risiko pemanjangan fase inflamasi semakin rendah. Seiring dengan makin cepatnya jaringan masuk ke dalam proses proliferasi, waktu penyembuhan luka juga akan semakin pendek.²⁰

Keterbatasan

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 .

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek terapi *ozonated VCO* pada luka. Pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat meneliti efek dan dosis toksisitas dari *ozonated VCO*.

Selain itu penelitian ini dilakukan pada media hewan coba tikus, tidak menutup kemungkinan media penelitian dapat ditingkatkan menjadi uji klinis kepada manusia.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, *ozonated VCO* dosis bertingkat efektif terhadap proses penyembuhan luka *full thickness skin graft autologus* tikus *Sprague Dawley* ditinjau dari makroskopis luka, ekspresi TGF- β dan jumlah neutrofil dan dapat ditarik simpulan: (1) *Ozonated VCO* efektif dalam meningkatkan respon penyembuhan luka FTSG ditinjau peningkatan ekspresi TGF- β pada hari ke-12 dibandingkan hari ke-6 perawatan. (2) *Ozonated VCO* efektif dalam meningkatkan respon penyembuhan luka FTSG ditinjau dari penurunan jumlah neutrofil pada hari ke-12 dibandingkan hari ke-6 perawatan.

Ozonated VCO dengan dosis 200 mg/ml paling efektif dibandingkan dengan dosis 50 mg/ml dan 100 mg/ml dalam proses penyembuhan luka *full thickness skin graft*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*. 2001 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452260>.
2. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings - a review. *BioMedicine*. 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615539>.
3. 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
4. Degli AI, Ginelli E, Mazzacane B, et al. Effectiveness of a Short-

- Term Treatment of Oxygen–Ozone Therapy into Healing in a Posttraumatic Wound. *Case Rep Med*. 2016;2016: 9528572
5. Wyatt J. *Forensic Medicine*. New York: Oxford University Press; 2011. p 138
 6. Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, *et al*. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair and Regeneration*. 2010;19(1): 107–15
 7. Coşkun S, Güleç EG, Balabanlı B, Acartürk F. Effects of epidermal growth factor on lipid peroxidation and nitric oxide levels in oral mucosal ulcer healing: a time-course study. *Surg Today*. 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593476>.
 8. Diegelmann RF. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004;9:283–9
 9. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma*. 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415964>.
 10. Travagli, V., Zanardi, I., Valacchi, G., & Bocci, V. (2010). Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators of inflammation*, 2010, 610418. <https://doi.org/10.1155/2010/610418>
 11. Pai SA, Gagangras SA, Kulkarni SS, Majumdar AS. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Indian J Pharm Sci*. 2014;76(1):87–92.
 12. Zhang J, Guan M, Xie C, Luo X, Zhang Q, Xue Y. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by non invasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:273475
 13. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219–229.
 14. Yuniati R, Subchan P, Riawan W, *et al*. Topical ozonated virgin coconut oil improves wound healing and increases HSP90 α , VEGF-A, EGF, bFGF and CD34 in diabetic ulcer mouse model of wound healing [version 2; peer review: 1 approved with reservations, 1 not approved]. *F1000Research* 2021, 9:580 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.22525.2>)
 15. De Monte A, Gori C. Major ozonated autohemotherapy in the treatment of limb ulcers not responding to conventional therapy. Vol. 10, *International Journal of Ozone Therapy*. 2011;10:85–98
 16. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;2(7):379–388
 17. Borges GÁ, Elias ST, da Silva SMM, *et al*. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillofacial Surg [Internet]*. 2017;45(3):36470. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.005>.
 18. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci*. 2009/09/04. 2009;122(Pt 18):3209–13.
 19. Orsted Heather L. *et al*. KDH. *Skin: Anatomy, Physiology and Wound Healing*. Canada: Canadian Association of Wound Care; 2018. p. 7–23.
 20. Shah JMY, Omar E, Pai DR. Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg [Internet]*. 2012 May [cited 2018 Dec 17];45(2):220–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162220>.