

## Efek Antifibrotik Ekstrak Etanol *Nerium indicum* Mill. dengan Marker 5 $\alpha$ -Oleandrin pada Sel Fibroblas Keloid

### Antifibrotic Effect of Ethanolic Extract of *Nerium indicum* Mill. Standardized 5 $\alpha$ -Oleandrin on Keloid Fibroblasts Cells

Mae Sri Hartati Wahyuningsih<sup>1</sup>, Fara Silvia Yuliani<sup>1</sup>, Dwiki Yuliya Rahmawati<sup>2</sup>, Annisa Nurul Pratiwi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan,

<sup>2</sup>Program S1 Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRAK

*Keloid adalah lesi kulit yang diakibatkan oleh proliferasi fibroblas abnormal dan pengendapan kolagen pada proses penyembuhan luka. Terapi medis untuk keloid relatif terbatas dan sebagian besar memiliki beberapa efek samping. Studi baru-baru ini menunjukkan bahwa 5 $\alpha$ -oleandrin dari *Nerium indicum* Mill. (*N. indicum*) memiliki efek anti keloid dengan menghambat (proliferasi, aktivitas migrasi dan ekspresi TGF- $\beta$ 1) fibroblas keloid. Penelitian lanjut dengan ekstrak *N. indicum* dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin perlu dilakukan untuk mengembangkannya sebagai agen anti keloid dengan melihat hambatan proliferasi, timbunan kolagen, dan migrasi fibroblas keloid. Aktivitas antifibrotik ekstrak *N. indicum* terhadap proliferasi fibroblas keloid diukur dengan MTT assay, sedangkan timbunan kolagen diamati dengan metode Sirius Red. Pengamatan migrasi fibroblas keloid dengan metode scratch assay menurut Liang et al. (2009). Ekstrak etanol *N. indicum* dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin dapat menghambat proliferasi fibroblas keloid dengan IC<sub>50</sub> 0.458  $\mu$ g/mL, juga menghambat timbunan kolagen dengan IC<sub>50</sub> 0.055  $\mu$ g/mL pada inkubasi selama 72 jam. Pada inkubasi 48 jam setelah pemberian ekstrak etanol 1.0  $\mu$ g/mL terjadi penghambatan migrasi secara signifikan dibandingkan dengan kontrol.*

**Katakunci:** Keloid, *Nerium indicum* Mill, proliferasi, kolagen, migrasi sel.

#### ABSTRACT

*Keloid is a skin lesion caused by an abnormal proliferation of fibroblasts and the deposition of collagen in the wound healing process. Therapy for keloids is relatively limited and mostly has side effects. Recent studies show that 5 $\alpha$ -oleandrin from *N. indicum* Mill. (*N. indicum*) has anti-keloid effect by inhibiting (proliferation, migration activity and TGF- $\beta$ 1 expression) keloid fibroblast. Further studies with *N. indicum* extract standardized 5 $\alpha$ -oleandrin should be conducted to develop it as an anti-keloid agent by performing at proliferative effects, collagen accumulation, and keloid fibroblast migration. The antifibrotic activity of *N. indicum* extract on the proliferation of keloid fibroblasts was measured by MTT assay, whereas collagen deposits were observed by Sirius Red method. Observation of keloid fibroblast migration by scratch assay is according to Liang et al. (2009). Ethanol extract of *N. indicum* standardized 5 $\alpha$ -oleandrin can inhibit the proliferation of keloid fibroblas with IC<sub>50</sub> 0.458  $\mu$ g/mL, also inhibited collagen deposits with IC<sub>50</sub> 0.055  $\mu$ g/mL at incubation for 72 hours. In incubation 48 hours after treatment with ethanol extract of 1.0  $\mu$ g/mL occurred inhibition of migration significantly compared with control.*

**Keywords:** Keloid, *Nerium indicum* Mill, proliferation, collagen, cell migration.

#### PENDAHULUAN

Keloid merupakan pertumbuhan jaringan ikat padat yang menginvasi ke luar batas luka yang sebenarnya. Ciri-ciri dari keloid adalah lesi menonjol, terfiksasi, seringkali terasa gatal dan nyeri, dan tidak regresi spontan (Chike-Obi et al., 2009). Keloid pada kulit merupakan kelainan

makroskopis struktur, fungsi normal, bahkan diketahui memiliki fibroblas yang fenotipnya berbeda dengan fibroblas kulit normal (Naitoh et al., 2001). Pada jaringan parut keloid terdapat fase inflamasi yang memanjang disertai infiltrasi sel imun sehingga aktivitas fibroblas lebih besar dan lebih banyak matriks ekstraseluler yang terdeposisi, dan terjadi degradasi kolagen yang tidak seimbang (Brown & Bayat, 2009; Seo et al., 2013). Penyakit keloid dapat berdampak pada

\*Corresponding author : Mae Sri Hartati W  
Email : maeshw98@gmail.com

keadaan fisik, estetik, psikologis, dan sosial penderita (Bayat *et al.*, 2005).

Sampai saat ini banyak pilihan terapi dalam penatalaksanaan keloid namun belum memberikan hasil yang memuaskan dan sering didapatkan respon yang kurang maupun kekambuhan yang masih tinggi (Goldsmith *et al.*, 2007; Gauglitz *et al.*, 2011). Oleh karena itu, penelitian terus dilakukan khususnya penggunaan bahan herbal yang diyakini mampu menghasilkan efek yang baik dengan efek samping minimal (Arno *et al.*, 2014).

Akhir-akhir ini banyak penelitian dilakukan untuk mencari alternatif pengobatan keloid menggunakan bahan alam yang diyakini dapat menyembuhkan dan menekan efek samping obat. Salah satu bahan alam berkhasiat obat yang banyak diteliti manfaatnya untuk kasus seperti kanker dan keloid adalah tanaman *Nerium indicum* Mill. (*N. indicum*). Menggunakan metode *Bioassay guided isolation*, senyawa 16 $\beta$ -asetoksi-3 $\beta$ -oleandrosa-14 $\beta$ -hidroksi-5 $\beta$ -kardenolida (5 $\beta$ -oleandrin) berhasil diisolasi dari fraksi aktif daun *N. indicum* (Wahyuningsih *et al.*, 2000). Senyawa 5 $\beta$ -Oleandrin mempunyai efek sitotoksik terhadap berbagai sel kanker tetapi juga toksik pada sel normal secara *in vitro* (Wahyuningsih *et al.*, 2004). Isolasi lebih lanjut terhadap fraksi aktif *N. indicum* Mill didapatkan senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin (BM= 576), dengan sifat sitotoksik selektif pada sel HeLa dengan IC<sub>50</sub>. 8,38 x 10<sup>-6</sup>mM dan tidak toksik pada sel normal (Wahyuningsih *et al.*, 2006; 2008).

Studi baru-baru ini menunjukkan bahwa 5 $\alpha$ -oleandrin memiliki efek anti keloid dengan menghambat proliferasi, menghambat aktivitas migrasi dan ekspresi TGF- $\beta$ 1 fibroblas keloid (Dahlan, 2015; Dahlan *et al.*, 2018). Penelitian lanjut dengan ekstrak kloroform *N. indicum* yang telah dilakukan oleh Muhammad (2017) menunjukkan bahwa ekstrak kloroform *N. indicum* memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap kultur fibroblas keloid dengan nilai IC<sub>50</sub> 3,147  $\mu$ g/ml pada inkubasi 72 jam. Hal yang menarik pada aktivitas *N. indicum* terhadap Fibroblas keloid terletak pada ekstrak etanolnya. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji ekstrak etanol *N. indicum* Mill dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin dalam penghambatan proliferasi fibroblas keloid, timbunan kolagen, dan aktivitas migrasinya secara *in vitro*.

## METODOLOGI

### Bahan

Fibroblas keloid subkultur passase III dan IV koleksi dari Laboratorium Teknologi Kesehatan Departemen IKKK, FKMKM, UGM. Daun *N. indicum*

diambil dari daerah Pogung, Januari 2016, dan telah dideterminasi di dept. Biologi Farmasi, FF-UGM. Povidone Iodine 10%, DMEM (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco), Amfoterisin B (Fungison-Gibco™), Penisilin - Streptomisin (Gibco BRL), Ceftriakson, Tripsin EDTA 0,25% (Gibco), MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida} (Sigma), Dimetil Sulfoksida (DMSO) 99%, Formaldehid 10%, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Akuades (H<sub>2</sub>O), *Bouin solution*, Bahan pewarna picrosirius red, HCl 0,1N, dan NaOH 0,5N.

### Alat

*Laminary air flow hood steril* (Ebsco), flask steril, *96 well plate* (Iwaki), pipet pasteur, pipet ukur 10ml (Pyrex), pipet aid (Falcon), mikropipet (Biohit), *yellow tip, blue tip, white tip*, Tabung sentrifus (Biologix), Appendorf (Stardec), inkubator CO<sub>2</sub> (Galaxy S), petri steril, sentrifus, mikroskop inverted (Euromed), *Handheld Automatic Cell Counter* (Milipore Scapter), *plate shaker*, filter mikro 0,22 $\mu$ m (Millex™), *multiplate reader* (Imark biorad).

### Ekstraksi daun *N. indicum* Mill

Satu kg serbuk daun *N. indicum* diekstraksi secara maserasi dengan kloroform sebanyak 1 liter. Campuran diaduk secara berulang dan didiamkan selama 24 jam hingga kemudian didapatkan maserat. Maserat disaring dengan menggunakan corong Buchner sehingga dihasilkan sari dan residu. Residu dimaserasi lagi dengan cara yang sama sampai sebanyak tiga kali proses maserasi. Sari yang dihasilkan diuapkan menggunakan vakum rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak agak kental yang kemudian dituangkan ke dalam cawan porselin. Ekstrak kloroform dalam cawan porselin diuapkan lagi sampai menjadi ekstrak kental yang aktivitasnya telah dikerjakan oleh Muhammad *et al.* (2017). Residu terakhir dimaserasi dengan etanol 100% menggunakan cara yang sama seperti ekstrak kloroform. Ekstrak kental yang diperoleh dengan rendemen 8,2%. Ekstrak Etanol *N. indicum* inilah yang dilakukan untuk penelitian ini.

### Pengamatan keberadaan 5 $\alpha$ -oleandrin dalam ekstrak etanol *N. indicum*

Menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan membandingkan ekstrak etanol *N. indicum* Mill dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin. Fase diam yang dipakai adalah silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak adalah Petroleum eter: Etil asetat (1:3, v/v), kemudian dihitung nilai R<sub>f</sub> nya.

### **Pembuatan kadar uji ekstrak etanol *N. indicum***

Ekstrak etanol *N. indicum* Mill sebanyak 5 mg dilarutkan dengan 100  $\mu$ L DMSO sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 50.000  $\mu$ g/mL. Kemudian dibuat 6 serial kadar (0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 dan 10)  $\mu$ g/mL

### **Perlakuan uji ekstrak etanol *N. indicum* Mill**

Sejumlah  $2 \times 10^5$  sel fibroblas keloid/sumuran dimasukkan kedalam 96 well plate diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, semua media pada 96 well plate dibuang dan diganti dengan ekstrak *N. indicum* dengan serial kadar (0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 dan 10)  $\mu$ g/mL, yang masing-masing seri kadar ekstrak diberikan rangkap tiga (triplikasi). Kontrol negatif hanya berisi fibroblas dan media. Sel Fibroblas keloid didalam 96 well plate diinkubasi selama tiga hari pada inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37°C. Pada hari ke tiga, dilakukan pengukuran hambatan proliferasi fibroblas keloid dengan *MTT Assay*.

### **Pengamatan proliferasi fibroblas keloid dengan *MTT assay***

Pemeriksaan proliferasi fibroblas keloid menggunakan *MTT assay* diawali dengan menghisap semua medium yang ada pada tiap sumuran. Kemudian medium komplit baru sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan pada tiap sumuran dengan 50  $\mu$ L larutan MTT dengan konsentrasi 5mg/mL ditambahkan ke dalam sumuran tersebut. Selanjutnya plate dibungkus dengan aluminium foil, lalu diinkubasi dengan inkubator CO<sub>2</sub>, 37°C selama 6 jam. Medium dan larutan MTT dalam sumuran dihilangkan, diganti dengan 200  $\mu$ L DMSO pada setiap sumuran lalu digoyangkan. Selanjutnya glisin buffer 25  $\mu$ L dimasukkan pada tiap sumuran. Absorbansi dibaca menggunakan *multiple reader* pada panjang gelombang 570nm.

### **Pengamatan sintesis kolagen keloid dengan metode sirius red**

Sejumlah  $2 \times 10^5$  sel Fibroblas keloid/sumuran dimasukkan pada 96 well plate diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C selama 24 jam. Paska inkubasi 24 jam, semua media pada 96 well plate dibuang dan diganti dengan ekstrak *N. indicum* dengan serial kadar (0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 dan 10)  $\mu$ g/mL, yang masing-masing seri kadar ekstrak diberikan rangkap tiga (triplikasi). Kontrol negatif hanya berisi fibroblas dan media. Sel Fibroblas keloid didalam 96 well plate diinkubasi selama tiga hari pada incubator CO<sub>2</sub>

dengan suhu 37°C. Pada hari ke tiga, dilakukan pengukuran sintesis kolagen fibroblas keloid dengan metode Sirius Red.

Medium dari 96 well plate dihisap lalu dicuci dengan PBS 200  $\mu$ L tiap sumuran sebanyak 3 kali. Fiksasi dilakukan dengan Bouin solution selama 1 jam, dicuci dengan air mengalir hingga warna kuning hilang, plate dikeringkan satu malam, selanjutnya masing-masing sumuran ditambahkan 200 $\mu$ L sirius red yang telah dilarutkan dengan *saturated picric acid*, diinkubasi selama 1 jam, lalu sirius red yang tidak terikat dibuang dan dicuci dengan 200 $\mu$ L HCl 0,1 N sebanyak 3 kali hingga warna sirius red bersih dari dinding dan supernatan. Kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L NaOH 0,5 N, dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm dengan *multiplate reader*.

### **Pengamatan aktivitas migrasi Fibroblas keloid dengan metode scratch assay.**

Pengukuran migrasi sel dengan metode *in vitro scratch assay* Liang *et al.* (2009) dan dianalisa dengan metode yang digunakan Straatman (2008). Pembuatan luka pada migrasi sel kultur dilakukan dengan cara menggores atau *scratch* dasar sumuran dengan menggunakan 200-1000  $\mu$ L pipet tip (*blue tip*). Setelah perlakuan selesai semua kelompok di inkubasi selama 48 jam, namun setiap 24 jam dilakukan pengambilan gambar dimikroskopis menggunakan kamera miticam 350 dengan format JPG atau mikroskop *inverted* (EUROMED). Gambar yang diperoleh dari masing-masing *Well Plate* sampel kemudian dianalisa dengan menggunakan *software image J* sehingga diperoleh persentase area goresan. Persentase migrasi sel ditentukan dengan 100%-persentase area goresan.

### **Analisis hasil**

Setelah diperoleh persentase penghambatan proliferasi fibroblas dan timbunan keloid tiap serial kadar, maka dapat dihitung konsentrasi seri kadar ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan 50% populasi sel dan timbunan kolagen (nilai IC<sub>50</sub>) dengan analisis regresi probit menurut SPSS versi 21. Data pemeriksaan migrasi sel terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari komite etik Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan (FKKMK), UGM No. Ref: KE/FK/1254/EC/2016 dan No. Ref: KE/FK/0728/EC/2017.

### Hasil pengamatan keberadaan senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin dalam ekstrak etanol *N. indicum*

Keberadaan senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin dalam ekstrak etanol *N. indicum* dilakukan dengan metode KLT menggunakan fase diam Silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak PE: EtOAc (1:3, v/v). Visualisasi hasil dengan UV 254 dan 366 nm, serta reagen serum sulfat. Perhitungan Nilai Rf

$$\begin{aligned} R_f &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}} \\ &= \frac{3}{7} = 0.405 \end{aligned}$$

Pada Gambar 1 terlihat bahwa ekstrak etanol *N. indicum* (spot no 3) mengandung senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin (spot no. 2) dengan nilai Rf 0,405 setelah disemprot dengan pereaksi serum sulfat. Untuk ekstrak kloroform (spot no. 1) dengan reagen serum sulfat tidak nampak adanya bercak 5 $\alpha$ -oleandrin (spot no.2), hal ini menandakan bahwa 5 $\alpha$ -oleandrin terkonsentrasi pada ekstrak etanol. Hasil penelitian efek ekstrak kloroform *N. indicum* terhadap proliferasi fibroblas keloid dengan metode MTT didapatkan Nilai IC<sub>50</sub> 3,147  $\mu$ g/mL (Muhammad *et al.*, 2017). Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak kloroform ini lebih tinggi dibandingkan dengan IC<sub>50</sub> ekstrak etanol yaitu 0.458  $\mu$ g/mL. Hal ini berarti bahwa ekstrak etanol *N. indicum* dinyatakan lebih berpotensi dapat dikembangkan untuk agen antikeloid dimasa mendatang dibandingkan dengan ekstrak kloroform. Disamping itu berdasarkan gambar 1, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *N. indicum* telah mengandung senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin sebagai marker dengan harga Rf 0.405. Solven etanol dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar sampai semi polar, walaupun kadang senyawa non polar juga masih terlarut kalau proses ekstraksinya belum sempurna, tetapi apabila proses ekstraksinya sempurna maka senyawa-senyawa non polar akan masuk didalam pelarut kloroform yang sudah dilakukan oleh Muhammad *et al.* (2017). Keberadaan senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin dalam ekstrak etanol *N. indicum* sangat berperan dalam aktivitasnya sebagai antifibrotik. Hal ini telah banyak dibuktikan pada beberapa penelitian tentang aktivitas senyawa tersebut baik untuk antikanker maupun antikeloid. Keloid diketahui memiliki fibroblas yang fenotipnya berbeda dengan fibroblas kulit normal (Naitoh *et al.*, 2005). Karakteristik fibroblas keloid justru sama dengan karakteristik sel kanker secara umum, hanya perbedaannya adalah fibroblas keloid tidak dapat melakukan metastasis seperti yang terjadi pada sel kanker (Hanahan dan Weinberg, 2000). Hasil uji sitotoksik 5 $\alpha$ -oleandrin menggunakan metode

MTT terhadap berbagai sel kanker (EVSA-T; MCF-7; T47D; A498; H226, IGROV; M19; WiDR; HeLa dan Vero) secara *in vitro*, senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin paling selektif terhadap sel HeLa (IC<sub>50</sub> = 8,38 x 10<sup>-6</sup> mM), sedangkan 5 $\beta$ -oleandrin tidak selektif karena terhadap sel normal juga bersifat toksik (Wahyuningsih *et al.*, 2004; 2006; dan 2008). Mekanisme kerja senyawa 5 $\alpha$ -oleandrin pada sel HeLa dapat meningkatkan apoptosis melalui penurunan ekspresi protein Bcl-2 dan peningkatan ekspresi Bax (Wahyuningsih *et al.*, 2017)

### Hasil pengamatan proliferasi fibroblas keloid

Dari hasil pengamatan proliferasi fibroblas keloid tampak setiap sumuran yang berisi fibroblas berwarna ungu. Warna ungu ini merupakan garam formazan yang dihasilkan dari reaksi antara reagen MTT dengan enzim suksinat dehidrogenase sel fibroblas keloid. Pembacaan densitas optik (OD) dilakukan pada setiap sumuran untuk menentukan serapan gelombang cahaya sesuai dengan kepekatan larutan yang berbanding lurus dengan konsentrasi fibroblas keloid yang ada. Pembacaan ini dilakukan dengan menggunakan ELISA Reader pada panjang gelombang 570 nm. Persentase penghambatan dihitung menggunakan rumus:

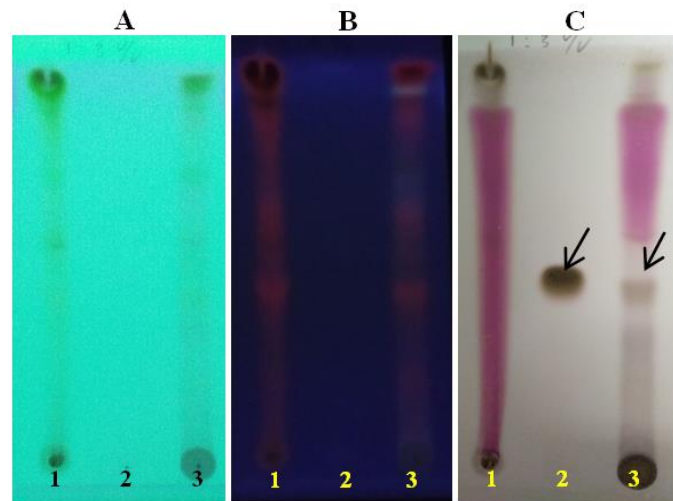
$$\% \text{ penghambatan } s = \frac{(A-C)-(B-C)}{(B-C)} \times 100\%$$

Keterangan :

A : Rata-rata absorbansi sampel uji B : Rata-rata absorbansi media + sel; C : Rata-rata absorbansi media

Persentase penghambatan yang sudah dihitung kemudian dianalisis dengan analisis regresi probit menggunakan software SPSS Statistic 21 version Windows untuk mencari nilai IC<sub>50</sub>. Hasil absorbansi dan persentase penghambatan proliferasi fibroblast keloid pada serial kadar 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125  $\mu$ g/m dengan inkubasi 72 jam (Tabel I).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antifibrotik ekstrak etanol daun *N. indicum*. Suatu bahan dikatakan memiliki aktivitas antifibrotik apabila bahan tersebut memiliki efek penghambatan proliferasi fibroblas, sintesis kolagen yang menyebabkan penurunan timbunan kolagen pada sel yang hidup. Pada inkubasi selama 72 jam dengan penggunaan konsentrasi kadar ekstrak 0,3125  $\mu$ g/mL terjadi penghambatan proliferasi fibroblas keloid sebesar 37.80% (Tabel I). Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan melalui analisis regresi probit (Gambar 2) dengan menggunakan SPSS versi 21 untuk Windows.



Gambar 1. Hasil KLT ekstrak *N. indicum* dan marker 5 $\alpha$ -oleandrin; 1: Ekstrak CHCl<sub>3</sub>; 2: Marker 5 $\alpha$ -oleandrin; 3: Ekstrak EtOH; Fase diam : Gel silika GF<sub>254</sub>; Fase gerak : PE:EtoAc (1:3,v/v); A: UV 254 nm; B: UV 366 nm; C: Serium Sulfat

Tabel I. Rerata absorbansi dan persentase penghambatan proliferasi fibroblas Keloid pada inkubasi 72Jam

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ekstrak EtOH <i>N. indicum</i>	
	Rerata absorbansi	Rerata penghambatan proliferasi fibroblas keloid (%)
10	0,1377	95.68
5	0,1340	96.30
2,5	0,1663	90.86
1,25	0,2477	77.17
0,625	0,3663	57.21
0,3125	0,4817	37.80
IC <sub>50</sub>		0.458 $\mu\text{g/mL}$

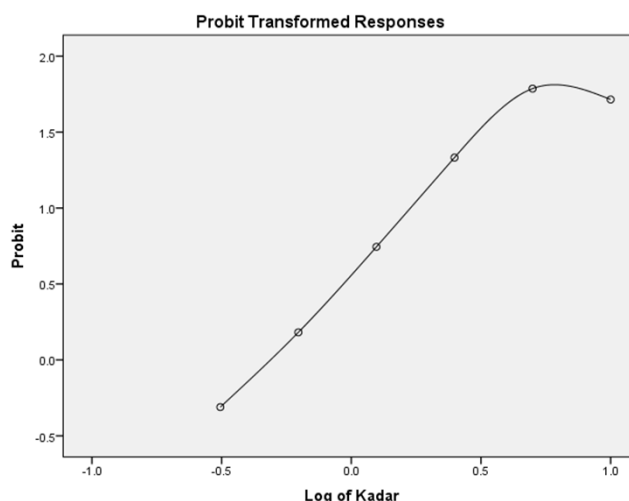
(Sumber dari Rahmawati DY, 2017)

Setelah dilakukan perhitungan IC<sub>50</sub> dengan analisis probit berdasarkan SPSS versi 21 didapatkan nilai IC<sub>50</sub> 0.458  $\mu\text{g/mL}$ . Pada Gambar 2. terlihat bahwa penghambatan pertumbuhan Fibroblas keloid meningkat setelah pemberian ekstrak etanol *N. indicum*. Presentase ini terus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi serial kadar ekstrak *N. indicum* yang digunakan, akan tetapi pada konsentrasi kadar 10  $\mu\text{g/mL}$  persentase penghambatan mengalami penurunan. Hal ini mungkin disebabkan hanya karena *human error* saja. Berdasarkan Prayong *et al.* (2008) sifat sitotoksik suatu bahan diklasifikasikan sebagai berikut: bahan dikatakan aktif apabila IC<sub>50</sub> < 100  $\mu\text{g/mL}$ , *moderate active* (100  $\mu\text{g/mL}$  < IC<sub>50</sub> < 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), tidak aktif (IC<sub>50</sub> > 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol *N. indicum* dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin bersifat aktif/toksik terhadap fibroblas keloid dengan nilai IC<sub>50</sub>, 0.458.

### Hasil pengamatan timbunan kolagen fibroblas keloid

Pengamatan timbunan kolagen menggunakan metode pewarnaan Sirius Red untuk mengetahui efek penghambatan pada timbunan kolagen yang telah terbentuk, kemudian dilakukan pembacaan *optical dense*-nya. Pewarnaan sirius Red mampu mewarnai kolagen dengan bereaksi pada ikatan asam sulfat dan grup asam basa yang terdapat dalam molekul kolagen. Berikut ini tabel Rerata hasil pengamatan efek ekstrak etanol *N. indicum* terhadap timbunan kolagen (Tabel II)

Efek antifibrotik ekstrak etanol *N. indicum* dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin salah satunya dengan mengukur timbunan kolagen fibroblas keloid yang hasilnya dinyatakan dengan nilai IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan melalui analisis regresi probit dengan menggunakan SPSS versi 21 untuk Windows (Gambar 3).



Gambar 2. Kurva perhitungan IC<sub>50</sub> ekstrak etanol *N. indicum* terhadap penghambatan pertumbuhan Fibroblas Keloid

Tabel II. Rerata absorbansi dan rerata persentase penghambatan sintesis timbunan kolagen keloid pada inkubasi 72 Jam

Kadar (µg/ml)	Ekstrak <i>N. indicum</i> (EtOH)	
	Rerata absorbansi	Rerata Penghambatan sintesis kolagen (%)
10	0.092	81.57
5	0.093	80.65
2,5	0.092	80.31
1,25	0.079	80.70
0,625	0.090	80.44
0,3125	0.193	45.66
0	0	0
IC <sub>50</sub>		0.055 µg/mL

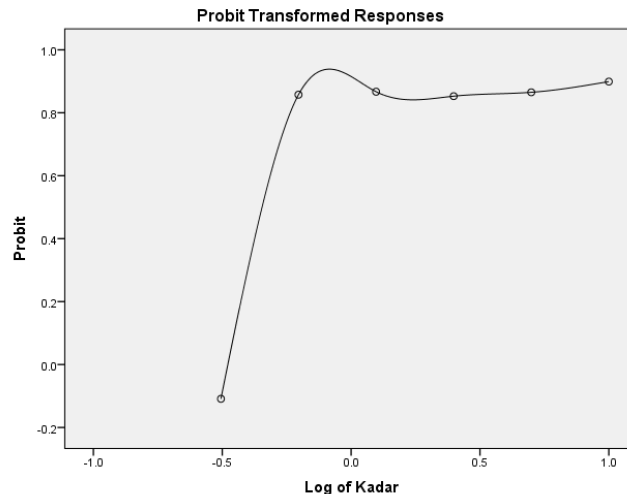
(Sumber dari Pratiwi AN, 2017)

Setelah dilakukan perhitungan IC<sub>50</sub> dengan analisis probit berdasarkan SPSS versi 21 didapatkan nilai IC<sub>50</sub> 0.055 µg/mL. Pada gambar 3 terlihat bahwa semakin meningkat kadar ekstrak etanol *N. indicum* seiring dengan peningkatan penghambatan sintesis timbunan kolagen pada fibroblas keloid. Fibroblas merupakan sel yang memproduksi antara lain adalah kolagen. Peningkatan produksi kolagen dipengaruhi oleh terjadinya proliferasi yang berlebihan sehingga jumlah matriks ekstraseluler pada keloid (Shaffer, 2002). Aktivitas antifibrotik dinyatakan dengan penghambatan proliferasi fibroblas, sintesis kolagen yang menyebabkan penurunan timbunan kolagen pada sel yang hidup. Senyawa 5α-oleandrin diketahui memiliki potensi menghambat plasminogen activator inhibitor-1, sehingga menyebabkan penurunan kadar enzim kolagenase yang memiliki peran penting pada proses degradasi kolagen pada jaringan parut. 5α-oleandrin diketahui memiliki efek menghambat pompa Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase yang memiliki peran

penting terhadap proses homeostasis dan sinyal kimiawi pada sel (Yang *et al.*, 2010). Hal ini sesuai dengan penelitian serupa dari Dahlan (2015) bahwa salah satu kandungan mayor dari *N. indicum* adalah 5α-oleandrin yang memiliki aktivitas menghambat timbunan kolagen fibroblas keloid, proliferasi fibroblas keloid, menghambat aktivitas migrasi fibroblas keloid, serta menghambat sintesis TGF-β1 fibroblas keloid.

#### Hasil pengamatan aktivitas migrasi fibroblas keloid

Pengamatan aktivitas migrasi fibroblas keloid antara kelompok kontrol dan perlakuan dengan kadar 2xIC<sub>50</sub> (1.0 µg/mL), IC<sub>50</sub> (0,5 µg/mL), dan 1/2xIC<sub>50</sub> (0,25 µg/mL) mengacu penelitian dari Rahmawati (2017) mengenai uji proliferasi ekstrak etanol *N. indicum* terhadap fibroblas keloid. Hasil rerata perhitungan aktivitas migrasi sel pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan inkubasi selama 48 jam diamati (Tabel III, Gambar 4).



Gambar 3. Kurva perhitungan  $IC_{50}$  ekstrak etanol *N. indicum* terhadap penghambatan timbunan kolagen Fibroblas Keloid

Tabel III. Nilai rata-rata persentase aktivitas migrasi sel fibroblas setelah perlakuan selama 48 jam dengan ekstrak etanol *N. indicum*

Perlakuan	Rata-rata aktivitas migrasi sel fibroblas keloid (%)
FK <sup>+</sup>	100,0 ± 1,64
NiE 0.25 µg/mL.	96,74 ± 3,32
NiE 0.5 µg/mL.	90,04 ± 3,82
NiE 1.0 µg/mL.	37,57 ± 3,71

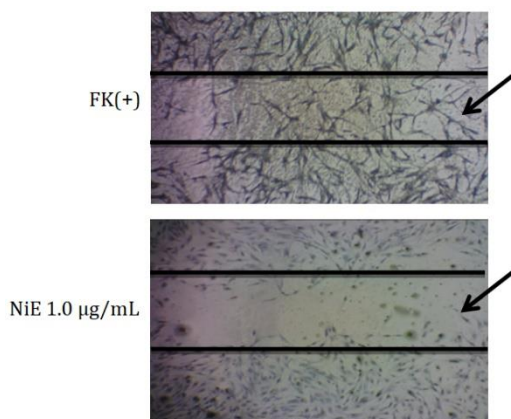
Keterangan: FK<sup>+</sup>= Fibroblas Keloid, NiE= Nerium etanol, kadar  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$  = 0,25µg/mL;  $IC_{50}$  = 0,5µg/mL, dan  $2 \times IC_{50}$  = 1,0 µg/mL.

Pada Tabel III. setelah dilakukan perhitungan aktivitas migrasi dengan mikroskop inverted (EUROMED) pada 48 jam perlakuan dengan ekstrak etanol *N. indicum* menunjukkan rerata perhitungan migrasi sel tertinggi pada kadar 1.0 µg/mL terjadi penurunan aktivitas migrasi sel fibroblas keloid. Pada kadar sedang yaitu 0,5µg/mL dan kadar rendah 0,25µg/mL, efek penurunan migrasi fibroblas keloid tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol *N. indicum* pada kadar 0,25µg/mL tidak memberikan efek hambatan migrasi fibroblas keloid. Namun demikian perbedaan antara kadar pemberian ekstrak etanol *N. indicum* dengan kelompok kontrol fibroblas keloid bermakna statistik ( $p < 0,05$ ).

Pada gambar 4 terlihat area goresan setelah pemberian ekstrak etanol *N. indicum* kadar (NiE 1.0 µg/mL) selama 48 jam belum mengalami penutupan dibandingkan dengan kontrol fibroblas keloid (FK<sup>+</sup>). Aktivitas migrasi pada kelompok kontrol (FK<sup>+</sup>) memiliki aktivitas

migrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4 terjadi penutupan area goresan sel pada *well plate* lebih cepat dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Fibroblas berperan penting pada fase proliferasi dalam proses penyembuhan luka dengan meningkatkan berbagai faktor pertumbuhan seperti VEGF, PDGF, FGF2, TGF-β, dan CTGF. Peningkatan faktor pertumbuhan memiliki peran dalam meningkatkan produksi ekstraselular matrix (ECM), dengan membentuk struktur kolagen dan diferensiasi sel. Fibroblas bermigrasi dan berproliferasi ke daerah luka kemudian akan berdiferensiasi menjadi miofibroblas yang ditandai dengan adanya ekspresi α-smooth muscle actin (α-SMA). Migrasi, proliferasi dan diferensiasi fibroblas sangat penting untuk meningkatkan daya kontraktif luka, pematangan jaringan granulasi, mendukung sinyal angiogenesis dan merangsang terjadinya epitelisasi (Desmouliere *et al.*, 2014). Salah satu senyawa utama yang terkandung dalam *N. indicum* adalah 5α-oleandrin yang terbukti aktif

sebagai antifibrotik terhadap sel fibroblas keloid dengan mekanisme kerja menghambat proliferasi, timbunan kolagen, migrasi keloid dan ekspresi TGF- $\beta$ 1 fibroblas Keloid lebih bagus dibandingkan dengan kontrol Mitomycin C (Dahlan *et al.*, 2017



Gambar 4. Contoh aktivitas migrasi sel fibroblas keloid pada 48 jam setelah perlakuan dengan ekstrak *N. indicum* 1.0  $\mu\text{g/mL}$  (100x). FK+= Fibroblas Keloid; NiE= Ekstrak etanol *N.indicum*, kadar 2IC50= 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ; Anak panah menunjukkan penghambatan migrasi.

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol *N. indicum* dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin dapat menghambat proliferasi fibroblas keloid dengan nilai IC<sub>50</sub>: 0.458  $\mu\text{g/mL}$ , mampu menghambat timbunan kolagen fibroblas keloid dengan nilai IC<sub>50</sub>: 0.055  $\mu\text{g/mL}$  pada inkubasi selama 72 jam. Pada inkubasi selama 48 jam setelah pemberian ekstrak etanol *N. indicum* dengan marker 5 $\alpha$ -oleandrin 1.0  $\mu\text{g/mL}$  terjadi penghambatan migrasi secara signifikan dibandingkan dengan kontrol.

## DAFTAR PUSTAKA

Arno, A.I., Gauglitz, G.G., Barret, J.P., Jeschke, M.G., 2015, Up-to-date Approach to Manage Keloids and Hypertrophic Scars: A Useful Guide. *Burns: Journal of the International Society for Burns Injuries*, 40(7): 1255-1266.

Bayat, A., Arscott, G., Ollier, W.E.R., McGrouther, D.A., Ferguson, M.W.J., 2005, Keloid disease: Clinical relevance of single versus multiple site scars. *British Association of Plastic Surgeons*, 58:28-37.

Brown, J. and Bayat, A., 2009, Genetic susceptibility to raised dermal scarring. *British Journal of Dermatology*, 161(1): 8-18.

Chike-Obi, C J., Cole, P.D., Brisset, A.E., 2009, Keloids: Pathogenesis, Clinical Features, and Management. *Seminars in Plastic Surgery*, 23(3):178-184.

Dahlan, I., 2015, Pengembangan 5 $\alpha$ -oleandrin isolasi dari daun *Nerium indicum* Mill. sebagai obat anti keloid Kajian in vitro pada Sel Fibroblas Keloid, *Disertasi*, . Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Dahlan, I, Wirohadidjojo, Y.W., Wahyuningsih, M.S.H., Aryandono, T., Soebono, H., 2018, 5 $\alpha$ -Oleandrin has better Anti-fibrotic effects than Mitomycin-C in Keloid Fibroblast Cultures, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Inpress.

Desmouliere, A., Darby, I.A., Laverdet, B., Bonté, F., 2014, Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*12: 301-311

Gauglitz, G.G., Korting, H.C., Pavicic, T., Rucicka, T., Jeschke, M.G., 2011, Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med*;17(1-2):113-25.

Goldsmith, L.A., Katz, S., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell, D.J., 2007. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*, Seventh Edition. 1st ed. McGraw-Hill Publishing, pp.553-554

Hanahan, D., Wienberg, R.A., 2000, *The Hallmarks of Cancer Cell*, 100, 57-70.

Liang, Y., Niederstrasser, H., Edwards, M., Charles, E., Jackson, John, A., 2009, Distinct roles for CARMIL isoforms in cell migration. *Mol Biol Cell*. 20(24): 5290-5305.

Muhammad, F., Yuliani, F.S., Wahyuningsih, M.S.H., 2017, Aktivitas Antifibrotik Ekstrak Klorofom *Nerium indicum* dalam Menghambat Proliferasi Fibroblas Keloid dengan MTT Assay, *Prosiding Seminar Nasional "Peran Herbal untuk mencegah Proses Degenerasi*, Auditorium Fakultas Kedokteran UGM, 22 April 2017, ISBN: 978-602-50277-0-3: p.46-50.

Naitoh, M., Kubota, H., Ikeda, M., 2005, Gene expression in human keloids is altered from dermal to chondrocytic and osteogenic lineage, *Genes to Cells* 10, 1081-1091

Naitoh, M., Hosokawa, N., Kubota, H., Tanaka, T., Shirane, H., Sawada, M., Nishimura, Y., Nagata, K., 2001, Upregulation of HSP47 and Collagen Type III in the Dermal Fibrotic Disease, Keloid, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280 (5): 1316-22



- Pratiwi, A.N., 2017, Aktivitas Antifibrotik Ekstrak Etanol *Nerium indicum* Mill dalam Menghambat Sintesis Kolagen Keloid dengan Metode Pewarnaan Sirius Red, *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Prayong, P., Barusrux, S., Weerapreeyakul, N., 2008, Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 79: 598-601
- Rahmawati, D.Y., 2017, Aktivitas Antifibrotik Ekstrak Etanol *Nerium indicum* dalam Menghambat Proliferasi Fibroblas Keloid dengan MTT Assay, *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Seo, B.F., Lee, J.Y., Jung, S.N., 2013, Models of abnormal scarring. <http://BioMed.Researchinternational.com/article/423147>
- Straatman, K., 2008. Wound healing assay. *J Mol Biol Cells*. (10): 1-4.
- Wahyuningsih, M.S.H., Wahyuono, S., Wayan, T., 2000, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif dari daun *Nerium indicum* Mill, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 11(2): 86-95
- Wahyuningsih, M.S.H., Mubarika, S., R.L.H. Bolhuis, K. Nooter, Ganjar, I.G., Wahyuono, S., 2004, Cytotoxicity of oleandrin isolated from the leaves of *Nerium indicum* Mill on several human cancer cell lines. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 15(2): 96-103
- Wahyuningsih, M.S.H., Mubarika, S., Ganjar, I.G., Hamann, M.T., Wahyuono, S., 2006, Identification of Cardenolide compounds as selective anticancer isolated from *Nerium indicum* Mill. Leaves and its cytotoxic effect, *Journal of Traditional Medicine*, 11(37): 13-19.
- Wahyuningsih, M.S.H., Mubarika, S., Bolhuis, R.L.H., Nooter, K., Oostrum, R.G., Wahyuono, S., Gandjar, I.G., 2008, Selectivity of Compounds Isolated from the Leaves of *Nerium indicum* Mill. on Various Human Cancer Cell Lines, *The Medical Journal of Malaysia*, Suppl. A, 63: 24-25.
- Wahyuningsih, M.S.H., Mubarika, S., Ganjar, I.G., Wahyuono, S., Takeya, T., 2017, 5 $\alpha$ -oleandrin reduce Bcl-2 protein and increase Bax protein expression on Hela cervical cancer cell, *Univ Med*, 36(2): 102-109
- Yang, L., Pang, Y., Moses, H.L., 2010, TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 31: 220-227.