



PEMBERIAN EKSTRAK CURCUMA LONGA L. MENINGKATKAN PROLIFERASI SEL MEF YANG DILAKUKAN *SCRATCH TEST*

Afiat Berbudi¹, Muhammad Ifham Hanif², ✉ Almahitta Cintami Putri³

¹Mikrobiologi dan Parasitologi, RSU dr Hasan Sadikin Bandung, Indonesia

²Fakultas Kedokteran, Universitas Padjajaran Bandung, Indonesia

³Departemen Bedah RSU dr Hasan Sadikin Bandung, Indonesia

Info Artikel

Sejarah artikel :
Diterima 20 Agustus
2018
Disetujui 25 Januari 2019
Dipublikasi 31 Januari
2018

*Keywords: Curcuma longa
L; Proliferasi fibroblast;
Scratch test*

Abstrak

Prevalensi luka yang tinggi masih menjadi permasalahan tersendiri dalam proses penyembuhan. Penanganan luka yang tidak tepat dapat menyebabkan gangguan penyembuhan sehingga proses penyembuhan menjadi panjang. Untuk itu perlu alternatif pengobatan yang dapat mempersingkat penyembuhan dengan biaya pengobatan yang lebih murah. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Curcuma longa L. terhadap peningkatan proliferasi sel mouse embryonic fibroblast yang dilakukan scratch test secara in vitro dengan metode penelitian menggunakan desain eksperimen in vitro laboratoris dan dilakukan pengamatan selama 24 jam. Variasi konsentrasi ekstrak Curcuma longa L menggunakan dosis 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm dan 50 ppm. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak Curcuma longa L. mampu mempercepat proliferasi sel mouse embryonic fibroblast yang dilakukan scratch test dengan dosis optimum 2.5 ppm. Pada dosis ≥ 10 ppm tidak menunjukkan proliferasi pada sel mouse embryonic fibroblast tetapi menyebabkan toksisitas pada sel.

PROLIFERATION ENHANCEMENT OF CURCUMA LONGA L. EXTRACT TREATMENT IN MEF CELL CULTRES THAT TREATED BY SCRATCH TEST

Abstract

Wound prevalence is still high and becomes a problem of healing process. Improper wounds management can cause wound healing disturbance, so that the healing process will be longer. For this reason, alternative medicine is required to shorten healing process and reduce medical costs. This study aims to determine the effect of Curcuma longa L. extract on enhancement of mouse embryonic fibroblast cell proliferation carried out in vitro scratch test with the research method using a laboratory in vitro experimental design and 24 hour observation. Observations were carried out for 24 hours with variations in Curcuma longa L. extract concentration 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm and 50 ppm. The results showed that Curcuma longa L extract was able to accelerate the proliferation of mouse embryonic fibroblast cells which scratch test. After 24 hours, the highest gap closure were observed in mouse embryonic fibroblast cell culture using dose of 2.5 ppm of Curcuma longa L. extract administration. At a dose of ≥ 10 ppm it does not show proliferation in embryonic fibroblast mouse cells but causes toxicity to cells.

Pendahuluan

Penyembuhan luka terdiri dari 3 fase yang saling berhubungan dan tumpang tindih yaitu : inflamasi, proliferasi, dan maturasi.(Darby, Laverdet, Bonté, & Desmoulière, 2014; Guo & DiPietro, 2010) Gangguan pada salah satu fase akan menyebabkan kegagalan untuk maju ke tahapan penyembuhan luka yang normal. Penyembuhan luka seringkali memasuki kondisi inflamasi patologis karena proses penyembuhan yang abnormal.(Masir, Manjas, Putra, & Agus, 2012) Proses penyembuhan luka pada saat ini masih menjadi sebuah tantangan klinis. Proses penyembuhan luka yang memanjang menyebabkan tingginya biaya perawatan, sehingga perlu ada penelitian agar proses penyembuhan luka dapat berlangsung lebih singkat. (Yang et al., 2017).

Pengobatan alternatif untuk mempercepat penyembuhan luka sudah banyak dilakukan dengan menggunakan tanaman sebagai obat luka.(Kumar, Vijayakumar, Govindarajan, & Pushpangadan, 2007; Phan, See, Lee, & Chan, 2001; Priya, Gnanamani, Radhakrishnan, & Babu, 2002) Salah satu tanaman yang digunakan untuk penyembuhan luka adalah kunyit (*Curcuma longa L.*).(Cheppudira et al., 2013; Phan et al., 2001) *Curcuma longa L.* selain digunakan sebagai bumbu masak juga digunakan masyarakat sebagai pengobatan tradisional.(Sudirga, 2012) Beberapa studi menyebutkan bahwa tanaman *Curcuma longa L.* dengan unsur utama Curcuminoid dan minyak atsiri dijadikan sebagai obat luka.(Akbik, Ghadiri, Chrzanowski, & Rohanzadeh, 2014; Mohanty & Sahoo, 2017; Phan et al., 2001; Sidhu et al., 1998) Curcuminoid terdiri atas senyawa Curcumin dan keturunannya yang berfungsi sebagai efek anti mikroba, antispasmodik gastrointestinal, dan anti-inflamasi serta menghambat karsinogenesis dan pertumbuhan kanker.(Araujo & Leon, 2001) Minyak atsiri juga terdapat pada tanaman seperti akar wangi (*vetiveria zizanioides*), serai wangi (*cymbopogon nardus*), rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) yang walaupun tidak mengandung Curcuminoid, tanaman tersebut mampu mempunyai fungsi sebagai anti inflamasi dan anti bakteri.(Hasanah, Nazaruddin, Febrina, & Zuhrotun, 2011).

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa pengaruh Curcumin yang terdapat pada *Curcuma longa L.* meningkatkan proliferasi sel fibroblas pada proses penyembuhan luka. Kesimpulan tersebut didapatkan dengan metode *in vivo*.(Akbik et al., 2014; Sidhu et al., 1998) Studi yang dilakukan menunjukkan adanya peningkatan proses penyembuhan pada luka yang diobati dengan Curcumin jika dibandingkan dengan luka yang tidak diobati dengan Curcumin. Analisis PCR (Polymerase chain reaction)

menunjukkan adanya peningkatan mRNA TGF- β dan fibronectin pada luka yang diobati dengan Curcumin. (Sidhu et al., 1998)

Karena Curcumin yang dikandung *Curcuma longa L.* telah terbukti memiliki efek peningkatan perbaikan jaringan luka secara *in vivo*, pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap pengaruh ekstrak *Curcuma longa L.* pada kultur sel mouse embryonic fibroblast yang dilakukan scratch test untuk mengetahui efek ekstrak *Curcuma longa L.* terhadap kecepatan proliferasi sel maupun dosis optimum untuk memicu pertumbuhan sel mouse embryonic fibroblast. (Topman, Lin, & Gefen, 2013)

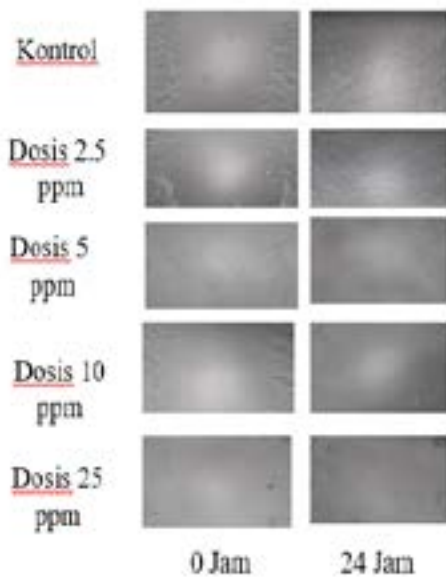
Metode

Penelitian ini merupakan eksperimen murni. Diawali dengan proses kultur sel yang dimana isolat sel mouse embryonic fibroblast (MEF) didapatkan dari koleksi Laboratorium kultur sel dan sitogenetik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Untuk kultur suspensi sel MEF dalam cryotube dicairkan dalam waterbath 37°C dan dipindahkan ke conical tube. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 800-1000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian endapan ditambahkan 10 ml media kultur dan dipindahkan kedalam flask, lalu dimasukkan kembali kedalam incubator sampai konfluens 70-80%. Untuk seeding, setelah medium dibuang sel-sel pada dasar flask dilepaskan menggunakan tripsin hangat, lalu diinkubasi pada 37 °C selama 2 menit, kemudian ditambahkan medium PBS hangat, lalu dicuci 2 kali dengan sentrifugasi 300 rpm, 6 menit. Setelah pencucian, ditambahkan medium untuk selanjutnya dilakukan seeding kedalam 24 well plate dengan jumlah masing-masing 250 ribu sel/well. Kemudian sel MEF dalam wellplate diinkubasi sampai konfluensi mencapai 100%. Selanjutnya dilakukan scratch test menggunakan tips kuning ukuran 100 μ l. Kemudian buang mediumnya dan cuci dengan PBS. Tambahkan 1 ml medium lengkap pada masing-masing well. Adapun untuk administrasi *Curcuma longa L* yaitu berupa intervensi Curcumin dilakukan terhadap pertumbuhan sel MEF secara *in vitro*. Intervensi dilakukan dengan pemberian ekstrak *Curcuma longa L.* pada kultur sel MEF. Kedalam well dimasukkan 1000 μ l medium yang mengandung dosis 2.5, 5, 10, dan 25 ppm ekstrak *Curcuma longa L.* Setiap perlakuan sel MEF dibuat 4 wells per perlakuan. Secara keseluruhan terdapat 5 jenis perlakuan. Untuk validasi dibuat 4 wells kontrol. (Krithikadatta, Gopikrishna, & Datta, 2014). Hasil data dari penelitian ini berupa persentase penutupan gap sel MEF setelah pemberian ekstrak *Curcuma longa L.* Luas gap diukur dengan menggunakan aplikasi ImageJ (open source). Analisa data mengguna-

kan Kruskal Wallis dan dilakukan uji analisis post-hoc Mann witney untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan.

Hasil dan Pembahasan

Dari hasil uji yang dilakukan, memperlihatkan bahwa sel mouse embryonic fibroblast mengalami pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan sel yang tidak diberi ekstrak Curcuma longa L.



Gambar 1. Luas gap pada kultur sel mouse embryonic fibroblast pada jam ke 0 dan setelah 24 jam diberi ekstrak Curcuma longa L. (Perbesaran 400 X)

Dari hasil pengujian dalam rentang waktu 0 - 24 jam menunjukkan sel mouse embryonic fibroblast mengalami pertumbuhan lebih cepat pada dosis 2.5 ppm dan mengalami penurunan pertumbuhan pada dosis 5 ppm. Pada dosis ≥10 ppm sel mouse embryonic fibroblast tidak dapat tumbuh.

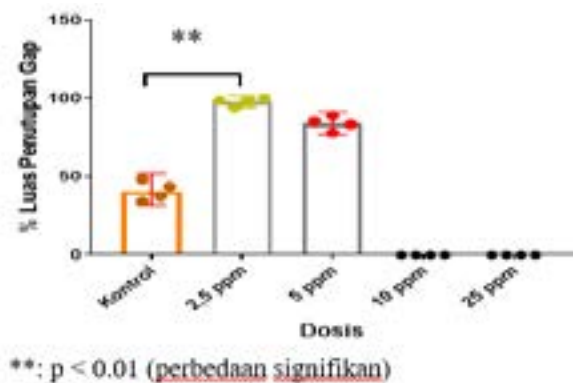
Tabel 1. Persentase luas pertumbuhan sel mouse embryonic fibroblast setelah 24 Jam

No	Perlakuan	Mean(%)	Min±Max (%)	Sd	P Value
1	Kontrol	40.89	34.17±48.32	6.32	
2	2.5 ppm	98.29	96.42±99.96	1.46	0.007
3	5.0 ppm	84.22	79.08±88.98	4.13	

Sumber: Data Primer (kontrol vs 2.5 ppm = 0.021; kontrol vs 5 ppm = 0.021; 2.5 ppm vs 5ppm = 0.021)

Dari tabel di atas terlihat penutupan gap pada kultur sel yang diberi 2.5 ppm lebih cepat dibandingkan dengan kontrol, dimana terjadi penutupan gap hingga 98.29%. Dari hasil uji statistik menggunakan

uji Kruskal Wallis menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan sel mouse embryonic fibroblast pada sel yang diberikan ekstrak Curcuma longa L. 2.5 ppm dibandingkan dengan kelompok kontrol (p < 0.01). Dengan demikian dosis efektif untuk mempercepat pertumbuhan sel mouse embryonic fibroblast adalah 2,5 ppm sedangkan pada dosis ≥10 ppm, sel mouse embryonic fibroblast mengalami kematian. Hal ini bisa dilihat dari hasil perlakuan pada dosis ≥10 ppm ekstrak Curcuma longa L. tidak lagi sebagai pemicu pertumbuhan sel mouse embryonic fibroblast melainkan bersifat toksik (racun) terhadap sel mouse embryonic fibroblast.



Gambar 2. Grafik perbandingan rerata persentase penutupan gap

Dari hasil eksperimen yang dilakukan terlihat bahwa ekstrak Curcuma longa L. mampu mempercepat pertumbuhan sel MEF pada pemberian 2,5 ppm. Hal ini dibuktikan dengan adanya peningkatan pertumbuhan pada sel yang diberikan ekstrak Curcuma longa L. pada dosis 2,5 ppm dibandingkan dengan kelompok kontrol setelah 24 jam inkubasi.

Dalam penyembuhan luka, sel fibroblas berperan mensintesis protein seperti kolagen dan elastin yang akan membentuk serabut kolagen, retikuler, elasticity, glycosaminoglycans, proteoglycans, dan glycoprotein dari matriks ekstraseluler.(Levenstein et al., 2006) Sehingga penting untuk mempelajari bahan bahan alam yang dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblas. Kemampuan ekstrak Curcuma longa L. dalam meningkatkan proliferasi sel MEF pada studi in vitro yang dilakukan dalam penelitian ini menggambarkan potensi Curcuma longa L. sebagai bahan dasar obat untuk meningkatkan penyembuhan luka. Meningkatnya proliferasi sel MEF dapat disebabkan adanya kandungan Curcumin dalam Curcuma longa L. Dari hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa Curcumin mampu meningkatkan TGF-β yang berperan dalam meningkatkan proliferasi sel fibroblas, sel-sel fibroblas dapat menghasilkan growth factor, salah satunya adalah basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF2).(Levenstein et al., 2006; Sidhu et al., 1998)

Ekstrak *Curcuma longa L.* memiliki fungsi anti-oksidan dan anti-inflamasi. (Menon & Sudheer, 2007) Dengan adanya fungsi anti-oksidan dan anti-inflamasi ini menyebabkan tahapan dari proses inflamasi menjadi cepat sehingga memicu proliferasi sel fibroblas lebih cepat. Anti inflamasi pada *Curcuma longa L.* berasal dari senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2 dan HX-XO). Pada dosis yang optimum hidrogen peroksida memberikan perlindungan optimal kepada keratinin yang dihasilkan oleh sel *mouse embryonic fibroblast*. (Menon & Sudheer, 2007; Phan et al., 2001)

Peningkatan konsentrasi pada dosis ≥ 10 ppm tidak menunjukkan proliferasi sel *mouse embryonic fibroblast*, tetapi menyebabkan toksisitas pada sel. Ekstrak *Curcuma longa L.* yang berlebihan untuk menetralkan reaksi dapat menyebabkan sitotoksitas. (Phan et al., 2001)

Penutup

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak *Curcuma longa L.* dapat mempercepat proliferasi sel *mouse embryonic fibroblast* terutama pada dosis 2, 5 ppm dan dapat bersifat toksik pada dosis ≥ 10 ppm yang ditandai dengan matinya sel *mouse embryonic fibroblast*. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk meneliti senyawa aktif apa yang ada pada ekstrak *Curcuma longa L.* yang memiliki efek terhadap peningkatan proliferasi sel *mouse embryonic fibroblast*.

Daftar Pustaka

- Akbik, D., Ghadiri, M., Chrzanowski, W., & Rohanizadeh, R. (2014). Curcumin as a wound healing agent. *Life sciences*, 116(1), 1-7.
- Araujo, C., & Leon, L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa L.* *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 723-728.
- Cheppudira, B., Fowler, M., McGhee, L., Greer, A., Mares, A., Petz, L., . . . Clifford, J. L. (2013). Curcumin: a novel therapeutic for burn pain and wound healing. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(10), 1295-1303.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301.
- Guo, S. a., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- Hasanah, A. N., Nazaruddin, F., Febrina, E., & Zuhrotun, A. (2011). Analisis kandungan minyak atsiri dan uji aktivitas antiinflamasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*). *Jurnal Matematika & Sains*, 16(3), 147-152.
- Krithikadatta, J., Gopikrishna, V., & Datta, M. (2014). CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 17(4), 301.
- Kumar, B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., & Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. *Journal of ethnopharmacology*, 114(2), 103-113.
- Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., & Thomson, J. A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem cells*, 24(3), 568-574.
- Masir, O., Manjas, M., Putra, A. E., & Agus, S. (2012). Pengaruh cairan Kultur Filtrate Fibroblast (CFF) terhadap penyembuhan luka; penelitian eksperimental pada rattus norvegicus galur wistar. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(3).
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of Curcumin *The molecular targets and therapeutic uses of Curcumin in health and disease* (pp. 105-125): Springer.
- Mohanty, C., & Sahoo, S. K. (2017). Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today*.
- Phan, T.-T., See, P., Lee, S.-T., & Chan, S.-Y. (2001). Protective effects of Curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 51(5), 927-931.
- Priya, K. S., Gnanamani, A., Radhakrishnan, N., & Babu, M. (2002). Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. *Journal of ethnopharmacology*, 83(3), 193-199.
- Sidhu, G. S., Singh, A. K., Thaloor, D., Banaudha, K. K., Patnaik, G. K., Srimal, R. C., & Maheshwari, R. K. (1998). Enhancement of wound healing by Curcumin in animals. *Wound Repair and Regeneration*, 6(2), 167-177.
- Sudirga, S. K. (2012). Pemanfaatan Tumbuhan sebagai Obat Tradisional di Desa Trunyan Kecamatan Kintamani Kabupaten Bangli. *Bumi Lestari*, 4(2).

- Topman, G., Lin, F.-H., & Gefen, A. (2013). The natural medications for wound healing—Curcumin, Aloe-Vera and Ginger—do not induce a significant effect on the migration kinematics of cultured fibroblasts. *Journal of biomechanics*, 46(1), 170-174.
- Yang, L., Zheng, Z., Qian, C., Wu, J., Liu, Y., Guo, S., . . . Kaplan, D. L. (2017). Curcumin-functionalized silk biomaterials for anti-aging utility. *Journal of Colloid and Interface Science*, 496, 66-77.